

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



Bc. Jakub Hojka

Introgresní zóna druhů *Arabidopsis lyrata* a *A. arenosa* ve střední Evropě

Introgressive zone of *Arabidopsis lyrata* and *A. arenosa* in Central Europe

Diplomová práce

Školitel: prof. RNDr. Karol Marhold, CSc.

Konzultanti: Roswitha Elisabeth Schmickl, Ph.D.

RNDr. Filip Kolář, Ph.D.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 8. 2018

Podpis

Poděkování

V první řadě chci poděkovat svému školiteli Karolovi Marholdovi za laskavou péči, takřka 24hodinový servis, který se mi od něho dostával v kritických posledních dnech před odevzdáním této práce, a také za trpělivost, s níž snášel mé mimofakultní závazky.

V první řadě také Roswithě Schmickl za spoustu nedocenitelných rad a podnětů, ať už se týkaly mého modelového systému, vědy nebo života. A také za spoustu probdělých nocí u zakládání herbářových položek v terénu.

Filipovi Kolářovi za neuvěřitelnou pomoc při analýze výsledků molekulárních dat.

Dále následujícími skvělým lidem v pořadí, které je zcela náhodné. Lence Mackové za to, že byla tou nejlepší osobní asistentkou, jakou jsem si mohl přát a za to, že jsme spolu v terénu zjistili, že čtyři hodiny spánku jsou zbytečný luxus. Gábině Šrámkové za psychickou podporu v krizových situacích a zasvěcení do záruků přípravy knihoven pro RADsekvencování. Tomášovi Urfusovi a Romče Bartošové za jejich cytometrické know-how a trpělivost, s níž snášeli všechny zrušené rezervace cytometru, nevrácené klíče a zapomenuté vzorky v laboratoři. Zuzce Chumové za pomoc s analýzami a překonáváním nástrah účetnictví a cestáků. Kristýně Šemberové, která by si na tvorbu nejkrásnějších map rozšíření mohla klidně založit firmu. Verče Konečné a Majdě Bohutínské za to, že mě zachraňovaly, když bylo v R nejhůř. Vojtovi Zeisekovi za analýzu surových molekulárních dat. Markovi Šlenkerovi za neskutečně užitečný soukromý kurz analýzy morfometrických dat a za pomoc v terénu. Jance Smatanové za její nepřekonatelné floristické know-how a odvalu s níž se se mnou pravidelně vydává do terénu. Fabianovi Bratzelovi za pomoc s analýzami DNA a měřením morfometrických znaků. Janu Ptáčkovi a Kláře Ondříčkové za to, že byli ti nejlepší spolužáci a za to, že mi automaticky připomínali všechny důležité termíny. Všem, kteří se mnou chodili na obědy a vařili mi kafe. Všem, na které jsem zapomněl.

Všem kolegům z divadla za to, že se mnou měli trpělivost, když jsem se věnoval vědě.

Všem kolegům z botaniky za to, že se mnou měli trpělivost, když jsem se věnoval umění.

Taky rodině a přátelům, ale ti o mně v poslední době skoro neslyšeli.

Abstrakt

Genetické složení hybridních zón velmi často reflektuje geografické a ekologické gradienty. Vhodným modelovým systémem pro testování této hypotézy může být hybridní zóna druhů *Arabidopsis lyrata* a *A. arenosa* ve střední Evropě. Jedná se o dva dobře vymezené avšak stále křížitelné druhy, jejichž potomci jsou plně fertilní. Kromě opakovaných hybridizačních událostí situaci komplikuje autopolyploidizace jednoho z rodičů - *A. lyrata* v oblasti nachází jako diploid nebo tetraploid. Hybridní zóna byla již popsána v předchozích pracích a ty prokázaly jistý gradient introgrese procházející oblastí. Oblast je navíc na přechodu alpského a panonského klimatu, oblastí prochází také výškový gradient (směrem z Předhůří Alp do nížinných oblastí Wienervaldu).

Tato práce je nejpodrobnější studií této hybridní zóny, jak co do počtu zastoupených populací, tak do množství získaných genetických dat (pomocí metody RADsekvencování). Jejich analýza ukázala jemný gradient introgrese, kdy na pólech studované oblasti nacházíme čisté rodičovské populace a směrem do středu introgresanty stále vyššího stupně. Uprostřed regionu se potom nachází geneticky intermediární hybridy. Analýza velikosti genomu ukázala, že hybridy mají intermediární velikost genomu oproti tetraploidním rodičům a tetraploidy *A. lyrata* mají vyšší monoploidní velikost genomu než diploidy. Možné vysvětlení těchto rozdílů představuje adaptivní evoluce (související mimo jiné s dynamikou repetitivních sekvencí) nebo genetický drift (např. efekt zakladatele nebo efekt hrdla láhve).

Morfometrická analýza potvrdila současné určovací znaky rodičů a ukázala morfologický gradient rodičů hybridů, kteří jsou ale obecně v některých znacích (např. na trichomech) intermediární. Gradient morfologických znaků reflektuje gradient velikosti genomu a nadmořské výšky. Ekologický gradient přináší hybridům značnou výhodu, protože jim nabízí habitaty, kde se rodiče nenacházejí a hybridy tu mohou mít selekční výhodu, ale zároveň jim zabraňuje v dalším šíření do míst již obsazených tetraploidy rodičovských druhů. Diploidní *A. lyrata* se ukazuje být kompetičně nejslabší a je dnes vázaná jen na některá ubývající reliktní stanoviště.

Klíčová slova: *Arabidopsis*, Brassicaceae, Cruciferae, introgrese, polyploidie, velikost genomu, morfologie

Abstract

Genetic composition of hybrid zones often reflects geographical and ecological gradients. Hybrid zone of *Arabidopsis lyrata* and *A. arenosa* in Central Europe can be convenient model system for testing such hypothesis. These are well circumscribed but still interfertile, and their offspring is fully fertile. Besides repeated hybridisation events, the current state is complicated by the autopolyploidisation events of one of the parents, namely *A. lyrata*, which is present in the area studied both as diploid and tetraploid. This hybrid zone was already described in previous publications, which showed certain gradient of introgression. Moreover, the area of the hybrid zone represents a transition between Alpine and Pannonian climate along an altitudinal gradient leading from the Prealps to the lowland Wienerwald.

The current thesis is the as yet most detailed study of this hybrid zone both in respect of number of studied populations and the amount of data acquired using the methods of RAD Sequencing, multivariate morphometrics and flow cytometry. The analysis of genetic data showed a gradient of introgression, where parental populations are placed at opposite ends, whereas genetically intermediate hybrids are placed in its centre. Analysis of the genome size showed an additional gradient, where hybrids possess intermediate genome size in comparison to the tetraploid parents. Monoploid genome size of tetraploids is higher than that of diploids. We proposed both adaptive evolution (connected with dynamics of transposons) and genetic drift (bottle-neck effect and founder effect) playing a role in those phenomena.

Morphometric analysis confirmed characters that are currently in use for the identification of both parental species. They showed a morphological gradient of parents and hybrids, where hybrids are generally morphologically intermediate (e.g. in shape of trichomes). The morphological gradient is correlated with that of genome size and altitude. The ecological (i.e., altitudinal) gradient brings considerable advantage for the hybrids, as it provides habitats, where parental taxa are absent and hybrids can acquire selection advantage, at the same time it prevents moving of hybrids towards habitats occupied by the parental taxa. Diploid *A. lyrata* seems to be competitively weakest and is currently restricted to disappearing relict stands.

Key words: *Arabidopsis*, Brassicaceae, Cruciferae, introgression, polyploidy, genome size, morphology

Obsah

1. Literární úvod	1
1. 1. Definice druhu	1
1. 2. Hybridizace	3
1. 3. Genový tok	4
1. 4. Vnitřní příčiny neúspěchu hybridů	4
1. 4. 1. Postzygotické reprodukční bariéry	5
1. 4. 2. Bariéry ve vývoji semene	5
1. 4. 3. Životaschopnost hybridů a jejich fertilita	6
1. 4. 4. Triploidní blok	7
1. 4. 5. Prezygotické reprodukční bariéry	7
1. 5. Vnější příčiny neúspěchu hybridů	8
1. 6. Úspěchy hybridů	9
1. 6. 1. Polyploidizace jako možnost překonání bariér genového toku	9
1. 6. 2. Exogenní selekce ve prospěch hybridů	9
1. 7. Hybridní zóny	10
1. 7. 1. Unimodální a bimodální hybridní zóny	10
1. 7. 2. Molekulárně-genetická variabilita v hybridní zóně	11
1. 8. Velikost genomu	12
1. 8. 1. Evoluční význam velikosti genomu	13
1. 8. 2. Mechanismy dynamiky velikosti genomu	14
1. 8. 3. Velikost genomu v hybridní zóně	15
1. 8. 4. Velikost genomu a polyploidizace	16
1. 9. Modelový systém	17
1. 9. 1. Hybridizace v rodu <i>Arabidopsis</i>	18
1. 9. 2. <i>Arabidopsis arenosa</i>	20
1. 9. 3. <i>Arabidopsis lyrata</i>	21
1. 9. 4. Středoevropská hybridní zóna	22
1. 9. 5. Taxonomické řešení rakouské situace	24
1. 10. Kladené otázky	25
2. Metodika	26
2.1. Rostlinný materiál	26
2. 2. Molekulární analýzy	26
2. 2. 1. Analýza molekulárních dat	27
2. 3. Cytometrické analýzy	28

2. 3. 1. Detekce ploidní úrovně	29
2. 3. 2. Měření relativní velikosti genomu	31
2. 4. Morfometrická analýza.....	31
2. 4. 1. Analýza morfometrických dat.....	32
3. Výsledky.....	34
3. 1. Molekulární analýza.....	34
3. 2. Cytometrická analýza	43
3. 2. 1. Ploidní úrovně.....	43
3. 2. 2. Velikost genomu	44
3. 3. Morfometrická analýza.....	47
3. 3. 1. Variabilita morfologických znaků napříč skupinami	47
3. 3. 2. Test normality a test na přítomnost korelovaných znaků	51
3. 3. 3. Analýza hlavních komponent.....	51
3. 3. 4. Kanonická diskriminační analýza	53
3. 3. 5. Klasifikační diskriminační analýza	55
3. 3. 6. Shoda analýzy morfologických znaků s výsledky ostatních analýz.....	56
4. Diskuze	59
4. 1. Genetická struktura studovaného systému	59
4. 2. Polyploidizační událost u <i>A. lyrata</i>	60
4. 3. Podoba hybridní zóny.....	60
4. 4. Ploidní úrovně	61
4. 5. Gradient velikosti genomu	62
4. 6. Velikost genomu jako adaptivní znak	63
4. 7. Rozšíření rodičovských druhů.....	65
4. 8. Evoluční historie <i>A. arenosa</i> a <i>A. lyrata</i> v oblasti	65
4. 9. Fenotypická plasticita u <i>A. arenosa</i>	66
4. 10. Stabilita morfologických znaků rodičů	67
4. 11. Morfologie hybridů	67
4. 12. Životní strategie.....	68
4. 13. Reflexe morfometrických znaků na gradientu altitudy a velikosti genomu	68
4. 14. Systematický pohled na situaci v regionu	69
4. 15. Důvod úspěchu hybridů.....	69
5. Závěr.....	71
6. Seznam použité literatury	73
7. Přílohy	80

1. Literární úvod

1. 1. Definice druhu

Druhy jsou v botanice, a v biologii obecně, definovány několika způsoby. Byť se i dnes čile traduje jistá představa o potřebě botanického druhu být morfologicky koherentní a jasně odlišitelný, třeba za pomoci nějakého určovacího klíče od ostatních, tak je starý systém definující druhy výhradně sadou morfologických znaků v dnešní době již překonaný.

Nabízí se tedy místo toho, co se zdá být již překonané, sáhnout po metodách, které se zdají být moderní, až neomylné, a místo morfologie využít moderních molekulárních metod.

Jistě, druhy je nepochybně možné vymezit pomocí molekulárně biologických metod, a s až matematickou přesností pak dovedeme určit, od kdy je již možné dvě skupiny jedinců považovat za samostatné druhy a kdy je lepší je vymezit například formou poddruhů jednoho druhu. Tato metoda se používá například v mykologii v systematice mikromycet, kdy je zcela přesně definováno, kolika substitucemi se liší druhy navzájem a o kolik méně substitucí postačuje pro definování nižších jednotek (např. poddruhů). Oproti takovému striktnímu přístupu, který je i v mykologii stále otázkou diskuze (Sarma, 2018) a který se pro definici druhů v botanice nepoužívá, je ale v praxi běžné a užitečné rozřazování jedinců do kategorií podle příbuznosti právě pomocí molekulárních metod. Molekulární metody se zde ale používají pouze jako metoda přinášející primární kategorie (tomu se někdy říká také genotypování), které jsou dále používány například v navazující morfologické či ekologické analýze. Molekulární analýza tedy neslouží jako metoda přímo a arbitrárně generující taxonomické jednotky, byť jejich definici do značné míry napomáhá. Základní jednotky různých úrovní stanovené molekulárními metodami sice nejsou primárně opsány jako nové druhy, ale skupiny, které si zasluhují uznání coby samostatné druhy, jsou z těchto jednotek vybrány na základě morfologických a ekologických znaků (Španiel et al., 2017a,b). Podobná metodika byla použita i při studii, která je obsahem této diplomové práce.

Jaká je však a priori, metodikou nezatížená a jednoduše lidskými smysly uchopitelná, představa biologického druhu? Je to jistá skupina organismů, vzájemně těsně příbuzných, jejichž zástupci se mezi sebou volně kříží, naopak se nekříží s jinými druhy, a produkují

životaschopné a fertilní potomky. Takové jednoduché představě nejlépe vyhovuje definice biologického druhu, která tvrdí, že druh zahrnuje všechny organismy bez problémů křížitelné mezi sebou a jejich potomky schopné další reprodukce. Mezi zástupci různých druhů pak musí existovat nějaká reprodukční bariéra (Mayr, 1996).

Takový koncept je nepochybně užitečný pro evoluční a systematické uvažování. Vždyť právě existence jisté reprodukční bariéry je tím, co druhům brání se mezi sebou křížit, zabraňuje tedy druhům existujícím v sympatrii nežádoucí rozřezávání reprodukčního potenciálu v mezidruhovém křížení, které nemusí být úspěšné (Harrison & Larson 2014). Reprodukční bariéra zároveň zabraňuje sbližování jejich genofondů, a podporuje tak speciaci. Existence funkční reprodukční bariéry je v některých evolučně-biologických modelech dokonce předpokladem úspěšné speciace, či odštěpení nového dceřiného druhu. Jednodušeji řečeno, evoluce se tak může rozběhnout odlišnými cestami v každém z dobře ustanovených samostatných druhů, bez toho, aby se osud obou linií komplikoval zpětnými kříženími spojenými s kontaminací jednoho genofondu alelami genofondu druhého.

Pro další uvažování předpokládejme dva druhy vzniklé kdysi v minulosti, které již během vývoje dostatečně segregovaly, druhy jsou tedy dobře rozlišitelné a co do genotypu unikátní. V ideálním světě by se takové druhy rozhodně nekřížily, jejich reprodukční okolnosti by již byly tak rozlišené, že by ke křížení při případném opětovném přiblížení areálů (a vzniku sekundárního kontaktu) ani vůbec nemohlo dojít. V reálných podmínkách se však i takové dobře odlišené druhy mohou křížit (dokonce se naopak budou křížit pravděpodobněji, než sympatricky rozšířené druhy, mezi nimiž již selekce vytvořila dostatečné reprodukční bariéry bránící rozmnožení) (Flegr, 2009).

Pokud tedy vznikají hybridy, výše zmíněná rovnováha genotypů bude narušena. Resp. ve většině případů tomu tak není, protože v naprosté většině případů vznikají hybridy buď neživotaschopní, nebo sterilní. V některých případech ale mohou být hybridy fertilní a mohou se křížit nejen mezi sebou, ale také se svými rodiči, může tedy docházet ke zpětnému křížení, což vede k tzv. introgresivní speciaci, neboli ke speciaci provázené genovým tokem.

Nyní se hodí poznamenat, že v několika předchozích odstavcích bychom klidně mohli slovo druh nahradit slovem evoluční linie, poddruh, nebo cytotyp. I takové jednotky, byť by

měly být nezávislé a reprodukčně izolované, se za některých podmínek mohou křížit a i těm bude dále věnován prostor.

1. 2. Hybridizace

Předpokládá se, že nezanedbatelná část rostlinných druhů vznikla pomocí hybridizace (Mallet, 2005). Vzhledem k tomu, že cesty, jak odhalit velmi staré hybridizační události, nejsou v současné době zcela známy, je možné, že se toto číslo bude nadále zvyšovat (Marques et al., 2018).

S hybridizací je v mnoha případech spojeno také navazující zpětné křížení (křížení hybridů zpětně s jedním z rodičů), které vede ke genovému toku, a tak i obohacení genofundu rodičovských populací. Takovou hybridizaci označujeme jako introgresivní hybridizaci (Anderson, 1949).

Introgrese slouží jako zdroj nové genetické variability, protože přináší nové alely do rodičovských populací. Tyto alely se potom preferenčně hromadí na místech nedávné hybridizace, čímž se dá na základě molekulárně-genetických dat odlišit variabilita nabytá introgresí oproti variabilitě pocházející z ancestrálního polymorfismu společného předka obou rodičů (shared ancestral polymorphism) - v takovém případě se budou všechny alely vyskytovat s podobnou frekvencí v celém areálu rozšíření (Renfrew & Barbujani, 1994).

Introgresí přenesené alely mohou obohatit genofond rodičovských druhů např. vnesením konkrétních alel pro adaptivní znaky, případně může introgrese „jen“ zvyšovat variabilitu některých rodičovských populací (Rieseberg & Wendel, 1993), což může mít význam pro speciaci. Speciaci ve smyslu mikroevolučních procesů v rámci rodičovských druhů, či speciaci ve smyslu ustanovení nového druhu z hybridního roje (Suarez-Gonzalez et al., 2016, Douglas et al., 2015). Na druhou stranu ale introgrese v některých případech způsobuje jev zvaný genetická eroze (v anglické literatuře někdy také genetic swamping), který může vést k vyhynutí vzácných druhů cestou genetického rozmělnění v kontextu okolních populací příbuzných druhů (Wolf et al., 2001). Takový případ představuje např. hybridizace zebry *Equus grevyi* s běžnějšími druhy. Stupeň introgrese je potom třeba citlivě uvažovat při ochraně druhu prostřednictvím křížení jedinců držených v zajetí, kteří jsou velmi často introgresí postiženi, a další křížení s volně žijícími jedinci může ještě snižovat úroveň „genetické čistoty“ populací (Ito et al., 2015). V botanice představuje

problém také genetická eroze způsobená hybridizací kultivovaných druhů s příbuznými vzácnými nativními druhy (Macková et al., 2018).

Kromě zprostředkování toku genů mezi rodičovskými populacemi mohou mít hybridy také vlastní evoluční význam. Ač se v naprosté většině případů hybridní linie neprosadí - hybridy buď nedojdou dospělosti, či jsou sterilní a odsouzení k vegetativnímu množení či apomixii, či po několika generacích dochází k jejich rychlému rozředění díky zpětnému křížení s rodičovskými druhy - mohou se za některých konkrétních podmínek naopak prosadit oproti svým rodičům a vytvořit hybridogenní druh. Třeba díky polyploidizaci, která umožní obnovení jejich fertility, nebo díky některému specifickému fenotypovému rysu, který jim umožní se rozšířit mimo rodičovské niky (Flegr, 2009).

1. 3. Genový tok

Genový tok označuje přesun alel mezi populacemi (Flegr, 2009). Může se jednat o přesuny alel v rámci různých populací jednoho druhu (například pomocí u živočichů časté migrace jedinců napříč populacemi, u rostlin k tomu může docházet pomocí přenosu pylových zrn nebo semen na dlouhé vzdálenosti), nebo o přesun alel mezi populacemi různých druhů, k čemuž dochází prostřednictvím hybridizace. Hybridy, jež v sobě snoubí genofondy obou rodičovských populací, potom mohou některé alely prvního druhu přenést zpět do druhého rodičovského druhu.

Genový tok je samozřejmě napříč druhy možný pouze v případě, že druhy tvoří fertilní hybridy, a ti jsou dále schopni křížení nejen mezi sebou, ale také s rodičovským druhem. Mezidruhový genový tok tak není triviální záležitostí a může selhat na spoustě úrovní.

1. 4. Vnitřní příčiny neúspěchu hybridů

Při studiu divergence, která může být krokem k budoucí speciaci, je výhodné využít hybridizačních událostí jako studijních systémů. Umožní totiž průzkum selekce v obou smyslech, jak selekce exogenní (vyvolané ekologickými parametry, interakcí s prostředím, či vnitropopulační nebo mezipopulační kompeticí), tak endogenní (která odstraňuje jedince, kteří jsou v jakémkoliv smyslu nefunkční, dochází u nich k nějaké nekompatibilitě genetické

či vývojové, apod.). Hlavním faktorem stojícím za divergencí může být klima, ale není radno podceňovat také vliv genového toku (Taylor et al., 2015).

1. 4. 1. Postzygotické reprodukční bariéry

Jako postzygotické reprodukční bariéry se označují takové, které nastávají až po vzniku zygoty, tedy úspěšném oplození. V takových rostlinných systémech dojde k opylení i oplození, ale poté selže některý z vývojových kroků při vývoji rostliny. Rostlina buď vůbec není schopna vytvořit embryo, nedojde k vytvoření či vyklíčení semene, či rostliny sice vyklíčí, ale jsou neživotaschopné, či sterilní.

Nejedná se ani tak o vlastnosti, které jsou předmětem selekce, a nejsou to tedy reprodukční bariéry, které rostliny samy vytvářejí, ale jde spíše o kauzální dopady spojení dvou rostlin, jejichž genomy nejsou kompatibilní a nevedou k vytvoření zdravé rostliny. Rostliny do vytvoření takových potomků vkládají značnou energii, která je ale promarněna, protože jejich potomky jsou rostliny s nulovou (pokud vůbec nevyrostou), či značně sníženou (jsou-li omezeny jejich reprodukční dovednosti) fitness. V selekci tak budou upřednostněny rostliny, které neplýtvají prostředky na vznik takových potomků, tedy rostliny, které vytvoří úspěšné prezygotické reprodukční bariéry (viz níže). To všechno povede k evolučním krokům znemožňujícím samotný vznik hybridů.

1. 4. 2. Bariéry ve vývoji semene

Pro zdárný vývoj semene jsou podstatné dva procesy - vlastní vývoj embrya, kdy nesmí být narušené mitotické dělení (k čemuž může dojít, pokud se rodičovské druhy liší karyotypem), a také vývoj endospermu, což je triploidní podpůrné a vyživovací pletivo v semeni.

Endosperm je triploidní, neboť obsahuje dvě sady chromosomů od matky a jednu od otce. Tento poměr může být narušen hybridizací s odlišným cytotypem a vývoj endospermu potom nemusí probíhat bezchybně. Snadno se díky tomu dá odhadnout, která křížení dají vzniknout triploidnímu endospermu, a tak i životaschopným hybridům.

Druhy *Arabidopsis arenosa* a *A. lyrata* (přesněji jeho evropský poddruh *A. lyrata* subsp. *petraea*, v jiném pojetí jako *A. petraea*) jsou vděčným objektem výzkumu genového

toku a také výzkumu vlivu polyploidizace na genový tok, protože se oba nachází ve dvou ploidních úrovních a z přírody známe jejich hybridy (to znamená, že mezi některými kombinacemi ploidíí tak musí ke genovému toku docházet).

Zatímco křížení dvou diploidů je velmi slabé co do možného genového toku, výsledky jsou nadějnější, kříží-li se diploid s tetraploidem (byť zde záleží na konkrétní kombinaci ploidíí i na tom, který z druhů je otcem a který matkou). Nejjednodušeji se uskutečňuje genový tok na tetraploidní úrovni (Lafon-Placette et al., 2017). To je fakt obecně známý i z předchozích studií, ale teprve ve zmíněné studii z roku 2017 byl nalezen možný důvod inkompatibility u hybridů dvou diploidních druhů v problémech s vývojem endospermu (Scott et al., 1998).

1. 4. 3. Životaschopnost hybridů a jejich fertilita

Podmínkou genového toku je úspěšná reprodukce, bez níž k přenosu alel nemůže dojít. První takovou podmínkou je fertilita hybridů. Pokud totiž hybrid nebude fertilní (či dokonce nebude ani životaschopný), nebude schopen dále přenášet rodičovské alely žádným směrem.

Hybridní rostliny jsou postaveny před náročný úkol - realizovat genetickou informaci dvou odlišných druhů, to samozřejmě nemůže vždy fungovat a hybridi jsou vystaveni velké spoustě potenciálních problémů z toho plynoucích a uplatňujících se při vývoji rostlin. První z nich byl již zmíněn výše, ale známe z přírody mnohem více příkladů, kde mohou hrát roli i jiná vývojová omezení, než konkrétní situace zmíněná výše.

Např. u rostlin druhu *Arabidopsis arenosa*, které se v přírodě nachází buď jako diploidi nebo jako tetraploidi, byli několikrát při cytometrii semen odhaleni triploidní jedinci (rostliny tedy neměly problém s vývojem endospermu a vznikla funkční semena), ti ale téměř nikdy nebyly odhaleni v přírodě, ani při experimentální kultivaci (Kolář et al., 2016a). Důvodem je zřejmě jejich neživotaschopnost, kdy triploidi hynou již brzy po vyklíčení. Neexistence triploidů ve volné přírodě, jejich naprostá neschopnost uplatnit se v kompetici, je tak účinným způsobem, jak je bráněno této cestě genového toku.

1. 4. 4. Triploidní blok

Ať jsou triploidi neviabilní, či jen sterilní, vytváří překážku v genovém toku, která se nazývá triploidní blok. Triploidi vznikají jako potomci křížení diploidů a tetraploidů a jsou tak ploidní úrovní, která může zajišťovat genový tok mezi diploidy a tetraploidy. V naprosté většině jsou ale triploidi buď neviabilní či sterilní, zpětná křížení tak nejsou možná a ke genovému toku nedochází (Marks, 1966).

Tato situace je velmi typická tam, kde došlo k novému ustanovení autopolyploidů. Triploidní blok zabrání zpětnému křížení s diploidy, téměř okamžitě tak dojde k vytvoření reprodukční bariéry mezi oběma ploidními úrovněmi, a obě ploidní úrovně se tak mohou dále vydat každá jinou, vlastní, evoluční cestou (Köhler et al., 2010). Příkladem může být situace ve druhu *Arabidopsis arenosa*, který se nachází jako diploid i jako tetraploid. Triploidi jsou však velmi vzácní a ke genovému toku, který se ukazuje být v některých případech možný, tak musí docházet jinou, komplikovanější, cestou (např. splynutím neredukované diploidní gamety diploidní rostliny s redukovanou diploidní gametou tetraploida). (Schatlowski & Köhler, 2012). Ne vždy ale musí být nález triploida svědectvím o styku dvou ploidních úrovní (třeba z různých populací, či v rámci smíšené populace). Triploidi mohou vzniknout také splynutím diploidní (neredukované) s haploidní (redukovanou) gametou, a díky tomu mohou být odhaleni v čistě diploidních populacích bez nutnosti křížení s tetraploidní rostlinou (právě tato cesta se uplatňuje při vzniku triploidů v populacích *A. arenosa*).

1. 4. 5. Prezygotické reprodukční bariéry

Všechny výše zmíněné skutečnosti bychom mohli zařadit do skupiny postzygotických reprodukčních bariér, tedy do reprodukčních bariér, které se projeví až po vzniku hybridní zygoty. Takové reprodukční bariéry se nachází u druhů, u nichž se nepředpokládá kontakt, a tedy ani opylení. Tedy u druhů vyskytujících se alopatricky. Pokud se druhy vyskytnou neočekávaně pospolu, dojde po delší době (pokud nejsou hybridy příliš úspěšní) k selekci ve prospěch prezygotických bariér. Rostliny tak ušetří prostředky, které by jinak promarnily v podobě neviabilní či sterilní zygoty.

V principu mezi takovou bariérou patří i alopatrie (druhy se mezi sebou vůbec nemohou křížit, protože jejich areály jsou striktně oddělené). Pokud se druhy vyskytují

sympatricky, vyvinou se u nich prezygotické reprodukční bariéry jiného druhu, např. v podobě úpravy reprodukčních systémů - vznik gametofytické či sporofytické inkompatibility, morfologická odlišnost v květních orgánech bránící opylení, specializace na jinou skupinu opylovačů, apod. Takové reprodukční bariéry mohou vést ke speciaci, a tedy i vzniku nových druhů (Husband & Sabara, 2004).

1. 5. Vnější příčiny neúspěchu hybridů

Výše byly zmíněny vnitřní příčiny bránící stabilizaci hybridní linie. Roli ale hrají také vnější příčiny, zejména v reakci hybridů na podmínky prostředí. Další vnější příčiny spočívají ve vnitropopulační kompetici.

Selekce proti hybridům znamená, že jsou v populaci v rámci vnitrodruhové (či vnitropopulační) kompetice upřednostněni jedinci „čistých“ rodičovských linií oproti hybridním jedincům. Třeba z toho důvodu, že mají nižší fitness oproti rodičovským druhům (např. proto, že jsou nedostatečně adaptováni na obě niky rodičovských druhů a prostředí jim nenabízí vlastní niku, kde by mohli dominovat) (Coyne & Orr, 2004). Jedná se tedy o post-zygotickou bariéru bránící rozšíření hybridní linie, která je poměrně běžná, pokud jsou obě rodičovské linie rozšířené sympatricky. Podobně může situace vypadat, i pokud dochází k selekci vyvolané některými vnějšími podmínkami (parazitismus, herbivorie), kterým hybridy snáze podléhají. V každém z případů sice hybridy stále vznikají, ale selekcí jsou neustále odstraňovány z populace (Gow et al., 2007).

Situaci velmi často ovlivňuje právě nepřítomnost již výše zmíněné speciální neobsazené niky, pak se může stát, že i hybridy, kteří se v laboratoři zdají superiorní, ve volné přírodě podléhají kompetici se svými rodiči (Hatfield & Schluter, 1999).

1. 6. Úspěchy hybridů

1. 6. 1. Polyploidizace jako možnost překonání bariér genového toku

Výše již bylo naznačeno, že jednou z cest, jak lze překonat reprodukční bariéru, je polyploidizace, neboli celogenomová duplikace. Rozeznáváme dvě její podoby, buď allopolyploidizaci, kdy polyploid má více genových sad, které pochází od různých druhů, a nebo autopolyploidizaci, která vzniká prostým znásobením genových sad jediného druhu.

Důvodem, proč je výhodné být polyploid při hybridizaci, je to, že mezi vyššími ploidními úrovněmi bude ke genovému toku docházet podstatně snadněji (Lövkvist, 1956). Může tak být například překonána bariéra související s vývinem endospermu (viz výše). Proto je hybridizace velmi často provázena také změnou ploidní úrovně - buď u jednoho z rodičů, který projde genovou duplikací před křížením s druhým rodičem, který je již polyploidem, případně může dojít k polyploidizaci až po proběhnutí hybridizace.

V takovém případě není polyploidizace řešením problému s reprodukční bariérou, ale je pro hybrida cestou, jak překonat problémy s nepárujícími se sadami chromosomů, a zajistit si tak vlastní životaschopnost (Hollister, 2015). Tomuto fenoménu se také někdy říká amfidiploidizace.

Někteří autoři se navíc domnívají, že polyploidizační událost je zárukou rychlejší speciace, protože mění rozložení genové exprese a poskytuje genetický materiál pro vznik vývojových novinek (Adams, 2007). To může znatelně urychlit mikroevoluční procesy, a tak i hybridní speciaci.

1. 6. 2. Exogenní selekce ve prospěch hybridů

Výše již bylo naznačeno, že v některých případech nemusí být problém s životaschopností a fertilitou hybridů a jediným důvodem, proč se hybridi neuchytí, je selekční výhoda rodičů, resp. selekční nevýhoda hybridů (viz odstavec o selekci proti hybridům v předchozí kapitole).

Tak to ale nemusí být ve všech případech, v některých případech mohou být hybridi naopak superiorní vůči rodičům. Důvodem takové superiority může být například fenotypická novinka, která jim může dávat selekční výhodu. Mohou být například odolnější

vůči některým abiotickým faktorům - např. suchu. Některé známé invazivní druhy také zřejmě dosáhli svého úspěchu díky hybridizaci (Zalapa et al., 2010).

Hybridi se také mohou uchytit v nikách, které jsou rodičům nedostupné. V ideálním modelovém případě může existovat intermediární nika, kde se budou preferenčně uchycovat hybridy. V podobné situaci se mohou ocitnout také allopolyploidi, či nově vzniklí autopolyploidi - jedinou zárukou jejich evolučního úspěchu je ekologická divergence, tedy obsazení ekologické niky dosud nevyužité rodičovskými druhy (druhem) (Soltis & Soltis, 2012).

Příkladem může být příběh z čeledi Brassicaceae. Ve Španělsku dochází ke vzniku kříženců mezi druhy *Cardamine pratensis* a *C. raphanifolia*. Ve většině lokalit se nachází všechny tři typy rostlin (oba rodiče i hybridy) pohromadě v hybridním roji, uspořádané bez jasných zákonitostí. Jedna populace je ale výjimkou - na lokalitě v průmyslu Puerto de Pajares se nachází obvyklá smíšená populace, kromě ní se ale na disturbovanějším habitatu poblíž cesty nachází také čistě hybridní subpopulace, sestávající geneticky pouze z jedinců s intermediárním fenotypem. To naznačuje, že hybridy mohou nacházet výhodu v narušovanějších stanovištích, kde se rodiče normálně nenachází (Lihová et al., 2007).

1. 7. Hybridní zóny

Podoby hybridních zón jsou značně variabilní. Od širokých hybridních zón s velkými místy překryvu rozšíření hybridů a rodičovských druhů (někde jsou hybridy značně zastoupeny až v podobě tzv. hybridního roje (hybrid swarm)), až po velmi omezené hybridní zóny s hybridy pouze v místě přímého styku rodičovských druhů (Gay et al., 2008; Arnold, 1992).

1. 7. 1. Unimodální a bimodální hybridní zóny

Někteří autoři vyvinuli vlastní metody dělení hybridních zón. Jedním z nejjednodušších je dělení takových zón na unimodální a bimodální. Nulovou hypotézu představuje unimodální hybridní zóna, to je taková hybridní zóna, v jejímž centru jsou zastoupeni hlavně geneticky intermediární jedinci (tedy ti, které bychom mohli nazvat pravými hybridy). Oproti

ní je složitější hypotéza hybridní zóny bimodální, v takové převažují jedinci podobní rodičům a mezi nimi je jen několik málo intermediárních hybridů. V takové hybridní zóně dochází zřejmě k selekci proti hybridům, případně hybridi nemají vhodnou ekologickou niku, kde by mohli začít dominovat. Introgrese je v takovém případě téměř nepřítomna (Harrison & Bogdanowicz, 1997). Třetí model představuje trimodální hybridní zóna, kde jsou přítomny tři různé genotypy - intermediární hybridní, dva rodičovské, a dále jsou přítomni introgresanti mezi hybridy a rodiči (Gay et al., 2008).

Hybridní zóny se mohou v průběhu času měnit a posouvat. K takovému posunu může docházet různým způsobem, podle převažujících ekologických procesů (Barton & Hewitt, 1985). Jedním z důvodů posunu hybridní zóny může být například selektivní výhoda jednoho ze zastoupených druhů (Goodman et al., 1999). Další důvody posunu hybridní zóny mohou být samozřejmě také vnější, můžou být vyvolané například změnami klimatu a navazujícími posuny ekologických nik. Takové změny mohou být hypoteticky vyvolané lidskou činností, nebo mohou být způsobeny dlouhodobými klimatickými změnami (např. změnami na konci posledního glaciálu) (Taylor et al., 2015).

1. 7. 2. Molekulárně-genetická variabilita v hybridní zóně

Geneticky vzato se v hybridní zóně nachází nejméně tři samostatné genotypy - genotypy obou rodičovských druhů a nově vzniklý hybridní genotyp, který by ale měl být kombinací genotypů obou rodičů. Hybridy přímo vzniklé křížením rodičů (F1 generace) by potom měli mít intermediární genotyp, hybridy F2 a dalších generací (generovaní zpětným křížením) potom budou mít větší procento zastoupení rodičovského genomu. Genotypy mohou být snadno rozlišeny na základě analýzy s programem Structure a stejný postup může být použit k odlišení rodičů a introgresantů různého stupně (Ito et al., 2015).

Pokud bude dostatečně dlouho docházet k hybridizaci a navazujícím zpětným křížením, dá se předpokládat, že potom vznikne velmi plynulý gradient od rodičů k hybridům, kdy populace ve středu hybridní zóny budou intermediární, a jak se budeme plynule po geografické škále blížit k pólům hybridní zóny, kde jsou umístěni rodiče, bude jejich podíl v zastoupení genotypů stále stoupat a zastoupení genotypu druhého rodiče se bude snižovat.

Zastoupení genotypů je samozřejmě značně nekonkrétní termín, přesněji by mělo být hovořeno o frekvencích specifických alel napříč hybridní zónou. Tyto frekvence pak budou také tvořit buď plynulý gradient (Slatkin, 1973), nebo bude gradient přetrhovaný díky probíhající disruptivní selekci, resp. selekci proti hybridům (Gay et al., 2008), k introgresi téměř nebude docházet (či jen ve velmi omezené míře). V takovém případě se bude hybridní zóna z molekulárně-genetického náhledu blížit spíše modelu bimodální hybridní zóny (viz výše).

1. 8. Velikost genomu

Během evoluce dochází k hromadění mutací v genomu, a s tím souvisí také probíhající chromosomové přestavby a oscilace počtu repetitivních sekvencí. Všechny tyto změny je možné odhalit a rekonstrukcí jejich posloupnosti složit dohromady historii studované skupiny.

Takové změny je možné odhalovat buď přímo - např. cytogenomickými metodami, které umožní přesně zmapovat karyotypy příbuzných druhů a porovnat je mezi sebou, nebo molekulárně-biologickými metodami, které nám mohou například poskytnout podrobné informace o repetitivních sekvencích.

Všechny tyto změny je ale možné sledovat mnohem jednodušeji, kvantitativně, prostým součtem těchto změn (inzerce či delece velkých částí chromosomů, výrazný nárůst repetitivních sekvencí, aj.) je totiž změna ve velikosti genomu, kterou je možné snadno a rychle změřit pomocí průtokové cytometrie.

Průtoková cytometrie je nenáročná, ale efektivní metoda, která se hojně používá v rostlinné systematice pro detekci ploidní úrovně a měření velikosti genomu (Kron et al., 2007a). V dnešní době již díky tomu známe velikost genomu pro řadu rostlin a existují také snahy tyto údaje katalogizovat, např. v databázi Royal Botanical Garden v Kew (<http://data.kew.org/cvalues/>).

Z výše zmíněného jasně vyplývá, že může docházet k divergenci velikostí genomu v rámci speciace. Velikost genomu se tak dá použít pro detekci hybridů, samozřejmě polyploidů, ale také třeba i druhů (Jedrzejczyk & Rewers, 2018).

1. 8. 1. Evoluční význam velikosti genomu

I přes výše zmíněné přednosti a přes neustále přibývajících množství studií je v principu pořád nejasné, jaký je evoluční význam velikosti genomu a jejích změn. Např. u hmyzu je známo, že velikost genomu může korelovat se způsobem života - parazitické či eusociální druhy mohou mít jinou velikost genomu, než jejich volně žijící příbuzní (Ardila-Garcia et al., 2010). Podobně u rostlin bývá velikost genomu asociována s invazivností (Rejmánek, 1996).

U severoamerické *Phalaris arundinacea* bylo uvažováno, že má značně menší genom v oblastech, kde se chová invazně, oproti oblastem, kde je původní. S tím by souvisela také vyšší růstová rychlost invazivních druhů (Lavergne et al., 2010). Tato zjištění však byla v pozdější studii vyvrácena a mezi invazivností a velikostí genomu nebyla nalezena žádná prokazatelná korelace (Martinez et al., 2018). U stejného druhu v Japonsku jsou ale veliké genomy prokazatelně vlastní rostlinám, které jsou pokládány za nejpůvodnější v oblasti, a neobvyklé (a zřejmě nepůvodní) genotypy mají velikost genomu menší (Akiyama et al., 2015). Pokud je problém stanovit trendy ve velikosti genomu v rámci jednoho druhu, o to náročnější bude snažit se nalézt nějaké trendy platné pro všechny rostliny.

Skutečnost, že velikost genomu mezi různými skupinami organismů v zásadě neodpovídá komplexitě organismu (resp. očekávanému počtu genů) a evolučnímu stáří, je popsána tzv. C-value paradoxem (Thomas, 1971), z něhož vyplývá, že důvody pro fluktuace ve velikosti genomu musí být způsobené něčím jiným než evolučním stářím nebo komplexitou. Tato skutečnost samozřejmě znejišťuje tvorbu jakýchkoliv hypotéz. Otázkou totiž zůstává také to, zda se velikost genomu mění spíše náhodně (vlivem např. hromadění selekčně nepodstatných úseků DNA), nebo zda může hrát roli v evoluci, a být tak z nějakého důvodu předmětem selekce.

Zajímavostí je, že se mezi rostlinami obecně nachází řada druhů s extrémně malými genomy (Ibarra-Laclette et al., 2013), ale také rekordman ve velikosti genomu mezi eukaryoty, jímž je *Paris japonica* (Melanthiaceae) (Pellicer et al., 2010). Způsoby, jak takové extrémní genomy vznikají, jsou komentovány v závěru tohoto oddílu.

Kromě variability velikosti genomu mezi druhy, je třeba také uvažovat velikost genomu a její rozdíly na úrovni jediného druhu. I v takovém systému je leckdy možné odhalit dílčí zákonitosti, které mohou pomoci při rekonstrukci fylogeneze. Například při studiu

velikosti genomu v druhu *Helianthus deserticola* byla zjištěná variabilita velikosti genomu napříč populacemi až 10 %. Populace s nejmenší velikostí genomu se nacházely v odlehlé nejjižnější části areálu a byly pravděpodobně z fylogenetického hlediska nejstarší (Baack et al., 2005).

1. 8. 2. Mechanismy dynamiky velikosti genomu

V dnešní době je obecně přijímanou představou, že velikost genomu nejvíce ovlivňuje dynamika repetitivních sekvencí. Repetitivní sekvence jsou v podstatě dvojího typu, jedná se buď o tandemové repeticce (takzvané satelity), nebo o transponovatelné elementy. Tyto oblasti genomu byly dříve považovány za tzv. junk DNA, dnes je ale rozšířená spíše představa, že mohou mít regulační funkci, protože mohou být v blízkosti kódujících genů a ovlivňovat jejich funkci i evoluční osud (Dodsworth et al., 2015).

Aktivita transponovatelných elementů i satelitů mohou vést ke změnám genové exprese, což může mít nepříznivé efekty na fenotyp. Rostliny se takovým účinkům brání zejména genovým silencingem, realizovaným prostřednictvím malých RNA a jimi působených methylací a podobných epigenetických modifikací (Matzke & Mosher, 2014), nebo pomocí histonových modifikací. To může vést k hromadění inaktivních repetitivních sekvencí, a tak i k plíživému nárůstu velikosti genomu.

Transponovatelné elementy a jejich přepisování může vést k narušení struktury chromosomů, může generovat chromosomové přestavby, relokace centromer, apod. Takové události mohou mít dále vliv na velikost genomu (Bennetzen & Wang, 2014) a kromě toho mohou vést ke ztrátám, či duplikacím genů, což hraje významnou roli v evoluci (Mandáková & Lysak, 2018).

Spíše pro pořádek je vhodné na tomto místě zmínit, že díky svému vlivu na genovou expresi jsou transponovatelné elementy, podle některých autorů, také hnací silou stojící za fenotypickou plasticitou rostlin (Lisch, 2013). Můžeme se pak jen domnívat, zda jsou morfologické gradienty korelující s gradientem velikosti genomu způsobené kauzalitou (za níž stojí třeba to, že je obojí výsledkem funkce transponovatelných elementů), či se jedná jen

o náhodu, protože jak na velikost genomu, tak na morfologické znaky působí shodné exogenní selekční tlaky (Oney-Birol & Tabur, 2018).

Co se týče extrémně velkých genomů, které byly zmíněny v úvodu tohoto oddílu, nejvýznamnějšími silami, stojícími za jejich vznikem i udržením, jsou zřejmě absence významných delecí spolu se slabou výměnou transponovatelných elementů (Dodsworth et al., 2015). U extrémně malých genomů, například u masožravé rostliny *Utricularia gibba*, je celkový počet genů přibližně stejný jako u ostatních rostlin, došlo ale k velikému omezení nekódujících sekvencí, a je zde přítomno velmi málo transpozonů, které jsou navíc inaktivní (Ibarra-Laclette et al., 2013). Transpozony se tak ukazují být možnými flukтуаčními silami, které stojí za C-value paradox (viz výše).

1. 8. 3 Velikost genomu v hybridní zóně

Velikost genomu představuje, jak již bylo poznamenáno výše, velmi užitečný nástroj pro detekci hybridů. Pokud se totiž hybridy liší velikostí genomu, dá se předpokládat, že F1 hybrid bude mít velikost genomu intermediární. To platí o hybridech vzešlých z homoploidní hybridizace. U rostlin vzešlých z hybridizace následované celogenomovou duplikací, je pak možné odhalit příslušné rodiče prostou rovnicí, kdy součet velikosti rodičovských genomů bude odpovídat přibližně velikosti genomu hybridu. Tak se dá velikost genomu využít pro analýzu původu allopolyploidů (Šlenker et al., 2018).

Takový, poměrně hrubý, přístup samozřejmě nedovolí naplno odhalit jemné nuance provázející ustanovení hybridních druhů. Proto je výhodné při studii allopolyploide sledovat nově vzniklé, uměle vytvořené hybridy v experimentálních podmínkách, které částečně odstiňují například efekt selekce a abiotických faktorů prostředí.

Při studii provedené na křížencích rodu *Helianthus*, byly pozorovány oscilace velikosti genomu, které neměly jasný trend se vzrůstajícím stupněm zpětných křížení. Takové oscilace genomu mohou být způsobené zvýšenou aktivitou transposomálních elementů, které mohou svou aktivitu zvyšovat v hybridech F1 generace, v dalších kolech křížení se pak může jejich aktivita snižovat, případně opět zvyšovat. Síly stojící za opakovanými oscilacemi velikosti genomu ale v rámci této studie nebyly odhaleny (Baack et al., 2005). Podle závěru autorů

není jisté, že hybridizace stojí za zvětšením velikosti genomu v rodu *Helianthus* v přírodních podmínkách. V současné době je tak otázka dynamiky velikosti genomu v hybridních zónách stále podceňovaným a neprozkoumaným tématem.

1. 8. 4. Velikost genomu a polyploidizace

Některé z aspektů evoluce allopolyploidů byly již zmíněny výše. Při uvažování evoluce nejen velikosti genomu, ale obecně evoluce genomu u polyploidů, je třeba uvažovat o základním cyklu, kterým prochází všechny rostliny, jež prošly celogenomovou duplikací. V průběhu historie rostlin došlo k několika celogenomovým duplikacím, které byly pro všechny rostliny společné. I výše zmíněná *Utricularia gibba* prošla nejméně třemi koly celogenomové duplikace (Ibarra-Laclette et al., 2013), od těchto událostí ale opět prošla procesy tzv. diploidizace, tedy zjednodušování a zmenšování genomu, kdy se z polyploidního genomu stává opět genom funkčně diploidní (Mandáková et al., 2010). To tedy představuje jistý trend směrem ke zmenšování genomu a dále i snižování chromosomového počtu u dobře zavedených polyploidních linií. Jaká je ale evoluce genomu ihned po polyploidizační události?

Dá se předpokládat, že u allopolyploidů budeme sledovat stejné trendy jako u hybridů, dojde tedy k vychýlení dynamiky transponovatelných elementů, které povede k jejich většímu hromadění, a tak i ke zvětšování genomu u F1 hybridů. Jak se bude hybridní druh ustanovovat, bude se ustanovovat i velikost genomu, která ale nemusí být na konci rozhodně stejná jako u diploidních předků (Španiel et al., 2018).

Studie na rodu *Nicotiana*, který je dobře prozkoumaným modelovým druhem a navíc z něho známe velké množství polyploidizačních událostí (Clausen, 1941), ukázala, že v některých případech mají polyploidi větší genom než jejich rodiče, a v některých případech je situace zcela opačná. Pozoruhodné je, že někdy můžeme sledovat opačný trend i u hybridů vzniklých původně v evoluci kombinací stejných rodičovských druhů. Molekulární studie, které byly na rodu *Nicotiana* provedeny a které zkoumaly ustanovení polyploidů, ukázaly, že výchyly ve velikosti genomu od rodičovských diploidních druhů jsou způsobeny změnami v zastoupení repetitivních sekvencí různých typů a také intergenomickými translokacemi. Byla odhalena možná zákonitost mezi rychlostí výměny ancestrálních repetitivních sekvencí

za nové a vzrůstem velikosti genomu. Naopak s poklesem velikosti genomu možná souvisí zachovávání ancestrálních repetitivních sekvencí. To jsou zřejmě mechanismy, které působí také u nepolyploidních a nehybridních druhů, ale polyploidizace a následný regulační chaos vzešlý ze vzájemného působení dvou odlišných genomů na sebe navzájem může tyto bouřlivé jevy urychlovat (Comai, 2005).

Hodné zaznamenání je také tvrzení, že u velmi mladých polyploidů spíše nedochází k výrazným ztrátám DNA, zatímco u starších polyploidů je ztráta DNA mnohem častější. To nahrává myšlence, že prvním záměrem nově vzniklého polyploida je spíše konzervovat a zachovat genetickou informaci obou rodičů tak, jak byla, vypořádat se s nástrahami redukčního dělení při větším počtu chromosomů (případně vzniku tetraivalentů u autopolyploidů), a až poté, po získání jisté stability, je možné nastoupit pomalu proces diploidizace (Leitch et al., 2008).

1. 9. Modelový systém

Rod *Arabidopsis* L (Brassicaceae), který v současném pojetí zahrnuje také řadu druhů patřících dříve do rodu *Cardaminopsis* nebo *Arabis*, obsahuje skupiny, které jsou ideálními modelovými objekty pro studium hybridizace, introgrese a polyploidní speciace.

Velkou výhodou představuje dobrá znalost genomu *A. thaliana* (L.) Heynh. a velké množství informací, které byly o tomto druhu získány během řady molekulárně-biologických, fyziologických i jiných studií, které na něm byly provedeny. Kromě toho je také k dispozici referenční genom druhu *A. lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz, který se dá použít pro anotaci genetických sekvencí některých dalších druhů, např. *A. arenosa* (L.) Lawalrée (Hu et al., 2011).

Mimo diploidního *A. thaliana* se v rodu nachází významný čistě diploidní druh - *A. halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz, dále dva široce rozšířené druhy, které se vyskytují jako diploidi a tetraploidi - *A. lyrata* a *A. arenosa*. Známe také tři malé druhy s omezenými areály rozšíření - v Itálii se nachází diploidní *A. pedemontana* (Boiss.) O'Kane & Al-Shehbaz, jemu je blízce příbuzný francouzský *A. cebennensis* (DC) O'Kane & Al-Shehbaz (k tomuto druhu jsou k dispozici jen nepřesvědčivé údaje o počtu chromosomů, podle nichž by

druh mohl být triploidní (Koch et al., 2008)). V Bosně a v Chorvatsku se nachází diploidní *A. croatica* (Schott) O'Kane & Al-Shehbaz (Al-Shehbaz & O'Kane, 2002).

Arabidopsis thaliana tvoří sesterskou skupinu všem ostatním druhům. Jeho specifické postavení v rámci rodu se odráží i v odlišném karyotypu. V diploidním stavu má totiž 10 chromosomů, zatímco ostatní výše vyjmenované druhy mají coby diploidi 16 chromosomů, to je ostatně i důvodem, proč má tak malý genom, zcela v souladu s mechanismy zmíněnými výše (Lysák et al., 2006).

1. 9. 1. Hybridizace v rodu *Arabidopsis*

V rodě rozeznáváme dva relativně staré a stabilní druhy hybridního původu. V obou případech se jedná o allotetraploidy s alespoň jedním diploidním rodičem.

Arabidopsis suecica (Fr.) Norrl. ex O.E.Schulz je skandinávský druh. Analýza jaderných mikrosatelitů ukázala, že se jedná o tetraploidy vzniklé křížením *A. thaliana* a *A. arenosa*. Předpokládalo se, že druh vznikl během jediné, unikátní události, která nastala zřejmě před ústupem glaciálu (Jakobsson et al., 2006), nicméně poslední studie (Novikova et al., 2017) poukazuje na jeho vícenásobný původ. Po ústupu glaciálu potom druh sledoval ústup ledu a šířil se severním směrem, tedy do míst, kde se již druh *A. thaliana* běžně nevyskytuje. I proto se dá předpokládat, že v tomto systému již k hybridizaci nedochází, jedná se o stabilní, dobře ustanovený, systém a hybridogenní druh si zaslouží být rozeznáván jako samostatný druh i taxonomicky (Jakobsson et al., 2006).

I druhý hybridogenní druh, *A. kamchatica* (DC.) K. Shimizu & Kudoh, je stabilní druh, který je dobře molekulárně odlišený od svých rodičů, kterými jsou v tomto případě *A. halleri* a *A. lyrata* (což jsou druhy, mezi nimiž byl pozorován genový tok, a tak existence takových hybridů nemůže být překvapením). Jedná se také o allotetraploida, který vznikl křížením dvou diploidů, po kterém navazovala celogenomová duplikace. Tento druh je samosprašný, narozdíl od svých rodičů. Vznik samosprášení je velmi často také důsledkem celogenomové duplikace a může být jednou z cest, jak polyploidie řeší případné reprodukční bariéry (Barringer, 2007). Druh byl původně rozeznáván jako poddruh *A. lyrata*, se kterým ho pojí

značná morfologická podobnost, ale v dnešní době se vymezuje jako samostatný druh *A. kamchatica* (Fuji et al.).

U *A. kamchatica* se rozlišují dva poddruhy, které se značně liší areálem rozšíření - *A. kamchatica* subsp. *kamchatica* se na chází ve východní Asii a zasahuje až na Aljašku. *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* se nachází v Japonsku, kde roste zejména na písčitých biotopech při pobřeží. Oba poddruhy se nevyskytují v sympatrii, jedná se o zcela izolované skupiny a také jejich vznik byl zcela nezávislý a stojí za ním nejméně dvě samostatné polyploidizační události. Další odlišnost je v životním cyklu - japonský poddruh je jednoletý, zatímco jeho východoasijský analog je vytrvalý.

V současné době stále probíhá genový tok mezi *A. kamchatica* a *A. lyrata*, což potvrdila analýza haplotypů, která prokázala v genomu *A. kamchatica* haplotypy *A. lyrata*, které ovšem nemohou pocházet z původní hybridizace (Shimizu-Inatsugi et al., 2009).

Mezi některými dalšími druhy rodu *Arabidopsis* usuzujeme na introgresivní hybridizaci, byť se zatím hybridi nezdáli být natolik významnými, aby odůvodnili svou existenci coby samostatný rostlinný druh. Introgrese je dobře známá mezi druhy *A. arenosa* a *A. lyrata* a je předpokládána také mezi druhy *A. lyrata* a *A. halleri* (v Asii utvořily životaschopné fertilní hybridy), které se ve střední Evropě často vyskytují v sympatrii.

Arabidopsis arenosa a *A. lyrata* (Obrázek 1) jsou dva dobře vymezené avšak navzájem křížitelné druhy, které navíc produkují životaschopné hybridy. Nutno však podotknout, že tyto hybridy jsou omezeny jen na několik území ve střední Evropě, protože jinak se tyto druhy na většině svého areálu rozšíření nepotkávají.



Obrázek 1. Vlevo *Arabidopsis arenosa*, vpravo *A. lyrata*. Autorka fotografií: Roswitha E. Schmickl

1. 9. 2. *Arabidopsis arenosa*

Arabidopsis arenosa je fenotypicky značně plastický druh, který se vyskytuje na širokém rozpětí biotopů od nížin až po vysokohorské oblasti. Co do rozšíření je známo, že centrum diverzity i místo původu druhu se nachází v Karpatech, z nich se ale druh po posledním glaciálu rozšířil na Balkán, do střední Evropy a také až k Baltskému moři. Druh se nachází ve dvou ploidních úrovních, na většině areálu je tetraploidní, diploidi se roztroušeně nachází v Karpatech, na Balkáně a u Baltského moře (Kolář et al., 2016a).

V současné době se usuzuje na jedinou polyploidizační událost, která dala vzniknout všem tetraploidním populacím. Zóny styku obou cytotypů jsou známy v Karpatech a ve Slovinsku. Z těchto oblastí známe několik smíšených populací, kde se nachází obě ploidní úrovně dohromady a zřejmě mezi nimi dochází ke genovému toku, byť jsou triploidi, skrz něž by ke genovému toku docházelo, velmi vzácní a z přírody je téměř neznáme. Důvodem je zřejmě jejich nevýhoda v exogenní selekci, kde podléhají kompetičně silnějším a stabilnějším diploidům a tetraploidům. Triploidní rostliny jsou totiž v experimentálních podmínkách nejen životaschopné, ale také fertily. Ke genovému toku mezi ploidními úrovněmi nicméně i přes jejich nízkou frekvenci výskytu sporadicky může docházet ((Kolář et al., 2016a).

Mezi oběma ploidními úrovněmi nedochází k segregaci podle nějakého ekologického gradientu, obě ploidní úrovně se nachází napříč různými habitaty a nejde tu sledovat žádnou jasnou závislost. Výjimku představuje specifický případ tzv. „železničního tetraploida“, který se velmi rychle šíří Evropou a je vázaný na habitaty spojené s lidskou činností, jak ostatně naznačuje už jeho neformální název. Tato linie je v současné době vázaná téměř výhradně na železnici a po ní putuje po střední Evropě (v současné době se nachází již v severních Čechách) a dále její kroky zřejmě povedou až do severní části kontinentu. Důvodem takového úspěchu jsou jisté fyziologické adaptace, např. ztráta vernalizace, která značně urychluje její životní cyklus, a dále schopnost lépe odolávat některým stresovým faktorům (Badel et al., 2016).

Ekologicky specifické jsou naopak jednotlivé polyploidní linie, které se nachází v různých nadmořských výškách a teplotních rozmezích. Jakékoliv studium adaptivních fenotypových znaků je nicméně u těchto rostlin komplikované, díky již zmíněné značné

fenotypické plasticitě. Rostliny jsou díky ní také variabilní v některých znacích životního cyklu, což jim umožňuje obsazovat pestřejší škálu habitatů. Můžeme hovořit dokonce o dvou dobře oddělených ekotypech - nížinném a horském. Nížinné rostliny jsou téměř plevelné, vytáhlé, mají urychlenou fenologii; zatímco horské rostliny jsou velmi kompaktní, mají sukulentní tendence a nacházejí se v extrémním prostředí s nižší kompeticí (Kolář et al., 2016b).

1. 9. 3. *Arabidopsis lyrata*

Arabidopsis lyrata podle současného pojetí zahrnuje dva taxony, které se liší svým rozšířením a také některými charakteristikami reprodukčních systémů. Podruh *A. lyrata* subsp. *lyrata* (podle některých, převážně evropských autorů, pouze *A. lyrata*) se nachází v Severní Americe a je ryze diploidní. Zvláštností je, že v některých okrajových populacích bylo pozorováno samosprášení (z jiných oblastí výskytu druhu takovou situaci neznáme), což je jev jinak v celém rodě *Arabidopsis* nepozorovaný (s výjimkou *A. thaliana*, ale o jeho exkluzivním postavení již bylo psáno výše).

V evropské části areálu rozšíření druhů hovoříme o poddruhu *A. lyrata* subsp. *petraea* (podle evropských autorů také *A. petraea*). Ten se nachází převážně cirkumarktický (na Islandu, ve Skandinávii a dále na Sibiři), ale známe také reliktní populace ve střední Evropě. Je známo, že severoevropské a středoevropské populace jsou navzájem značně geneticky izolované (s výjimkou komplikovanější situace na Islandu, kde se nachází genotypy odpovídající oběma liniím) (Ansell et al., 2010, Clauss & Mitchell-Olds, 2006). Zde je centrem rozšíření zřejmě Rakousko, ale druh se dále nachází v Čechách, na Moravě, v Německu a Maďarsku.

Co se ploidních úrovní týče, tak na většině svého euroasijského rozšíření se nachází *A. lyrata* subsp. *petraea* jako diploid. Ve střední Evropě se nachází také tetraploidní populace. Většina takových populací se nachází v místním centru diverzity v Rakousku, některé tetraploidní populace ale byly nalezeny i v dalších územích (Česká republika, Německo). Zaznamenané ploidní úrovně tvoří poměrně nejasnou strukturu a není jisté, zda jsou tetraploidní populace produktem jedné nebo více polyploidizačních událostí. Vyřešení

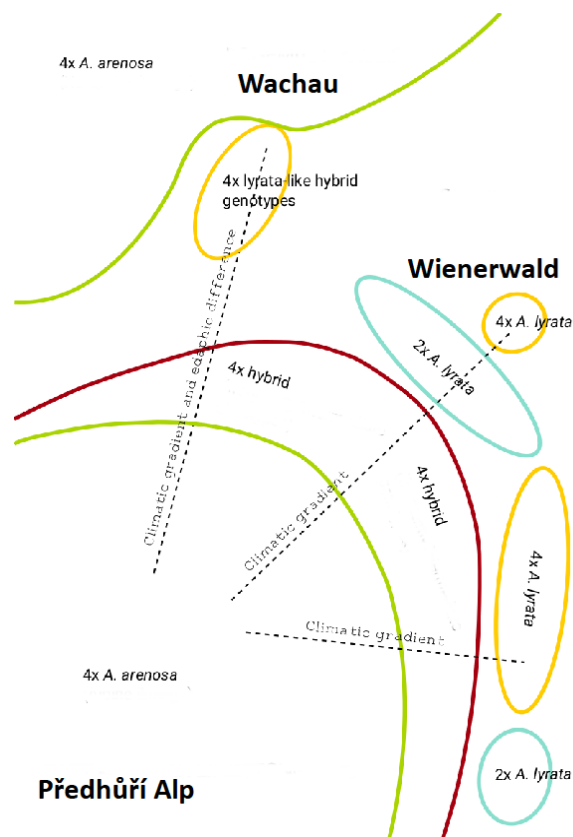
této otázky a obecně otázky fylogeografie *A. lyrata* bude jedním z témat mé budoucí dizertační práce.

1. 9. 4. Středoevropská hybridní zóna

Významná zóna styku obou druhů se nachází ve střední Evropě, kde do rozšíření alpské linie druhu *Arabidopsis arenosa* zasahuje reliktní území druhu *A. lyrata*, v Rakousku. Alpská linie *A. arenosa* se rozprostírá od západu, z území s vyšší nadmořskou výškou a drsnějším, alpínským klimatem, zatímco *A. lyrata* přichází z Panonie, z oblasti s nižší nadmořskou výškou i mírnějším klimatem.

Na styku obou druhů, v oblastech, které jsou intermediární v rámci výše zmíněných abiotických gradientů (zejména klimatických), se nachází rostliny, u kterých předchozí studie prokázaly určitý stupeň introgrese (Schmickl & Koch, 2011). Nachází se tu celkem dvě oblasti s hojným výskytem předpokládaných hybridů (Obrázek 2). První se nachází v oblasti Wachau a druhá v předhůří Alp (Voralpen). Situace v oblasti Wachau je komplikovanější, protože tu již není kontaktní zóna, jako v předhůří Alp, a situaci navíc komplikuje gradient v horninovém složení podložního substrátu. Oproti tomu je v předhůří Alp situace jednodušší, protože se tu jedná o prostý klimatický gradient. Má diplomová práce se bude zabývat pouze oblastí předhůří Alp, byť máme k dispozici i data z oblasti Wachau, ta ale nakonec nebyla do práce zahrnuta. Vzhledem k omezenému rozsahu této práce jsem se rozhodl nakonec zabývat pouze jednodušší a přímočařejší situací v předhůří Alp. Oblast Wachau bude zahrnuta v rámci plánované disertační práce a poznatky získané v této studii budou sloužit jako výchozí a srovnávací materiál.

Hybridi se tu nacházejí mezi rodičovskými druhy a předpokládáme, že rostou v intermediárních podmínkách, zřejmě pod vlivem selekčního tlaku, který na pólech zmíněného území zvýhodňuje čisté rodičovské populace.



Obrázek 2. Rozšíření druhů *A. arenosa* (zeleně) a *A. lyrata* (diploidi modře, tetraploidi žlutě) v Rakousku. Hnědě je vyznačeno rozšíření potenciálních hybridů. Autorka náčrtu: Roswitha Schmickl, úprava Jakub Hojka.

Předchozí studie provedené v dané oblasti zahrnovaly zejména snahy popsat genotypovou a cytotypovou variabilitu. Bylo prokázáno, že se tu nachází výhradně tetraploidní *A. arenosa*, zatímco *A. lyrata* se tu nachází coby diploid i tetraploid, byť tetraploidi byli dlouho přehlíženi (Polatschek, 1966).

Hybridní populace jsou tetraploidní, jedná se tedy zřejmě o allotetraploidy. Otázkou zůstává, zda došlo k hybridizaci s *A. lyrata* na diploidní, nebo tetraploidní úrovni. Co se hybridizační události týče, poprvé k ní došlo zřejmě krátce po ústupu posledního glaciálu. Provedená analýza jaderných mikrosatelitů nicméně naznačuje, že se v oblasti nachází jak velmi staré hybridní linie, tak i podstatně mladší linie, ke vzniku hybridů tedy zřejmě došlo opakovaně a i po jejich vzniku stále docházelo ke zpětným křížením s rodiči, a tak i ke genovému toku. Byl prokázán jednosměrný genový tok z *A. arenosa* (donor pylu) do

A. lyrata (akceptor) - podobné jednosměrné genové toky jsou známy i z ostatních hybridních taxonů v rodu *Arabidopsis* (Schmickl & Koch, 2011).

Pro detailní porozumění jevům v oblasti je třeba jednak navýšit počet zahrnutých populací, a získat tak informace o genotypu v jemnějším rozlišení, za druhé zkusit na hybridní zónu uplatnit metody, jejichž potenciál zde dosud nebyl naplno využit - morfologickou analýzu a analýzu velikosti genomu.

1. 9. 5. Taxonomické řešení rakouské situace

Morfologická analýza, za využití metod distanční morfometriky, může také ukázat, nakolik by bylo legitimní ustanovit hybridní skupiny jako samostatný druh (podobně jako u *A. suecica* a *A. kamchatica*). To by vyžadovalo kongruenci morfometrických, cytometrických i molekulárně-biologických parametrů. Otázkou také zůstává, zda je možné v oblasti bezpečně morfologicky rozlišit rodičovské taxony, vzhledem k vysokému stupni obousměrné introgrese. Standardní určovací příručky uvádí dva podstatné znaky pro determinaci rodičovských druhů - laločnatost druhého stonkového listu (u *A. lyrata* nedělaný, u *A. arenosa* dělený) a stupeň větvení trichomů na adaxiální straně růžicových listů – u *A. arenosa* bývají přítomny i trifurkátní trichomy, zatímco u *A. lyrata* jsou přítomny pouze jednoduché (vzácně vidličnaté) trichomy (Slavík, 2002, Al-Shehbaz and O’Kane, 2002).

1. 10. Kladené otázky

- Jaké je genetické složení studovaných populací? Existuje zde gradient introgrese? Jsou hybridy geneticky intermediární nebo jsou podobní některému z rodičů?
- Jaká je podoba hybridní zóny (je uspořádána podle převažujícího ekologického gradientu, či má mozaikovitý charakter)?
- Do jaké míry odpovídá genetická variabilita introgresní zóny její morfologické variabilitě? Vykazují hybridy s intermediárním genotypem v některých znacích intermediární fenotyp?
- Jaká je stabilita morfologických znaků rodičovských druhů? Do jaké míry jsou platné dosud používané morfologické determinační znaky uváděné v určovacích příručkách? Je třeba tyto znaky definovat znovu a jinak?
- Jaká je evoluční historie druhu *A. lyrata* subsp. *petraea* ve studované lokalitě? Jsou přítomné autotetraploidní linie výsledkem jediné polyploidizační události, nebo jich bylo více?
- Jaké trendy ve velikosti genomu můžeme pozorovat v oblasti?
- Pokud budou vypořádány nějaké trendy (genetické, morfologické, ve velikosti genomu), jsou tyto v korelaci s ekologickými gradienty (teplota, srážky, nadmořská výška, zeměpisná šířka, substrát)?

2. Metodika

2.1. Rostlinný materiál

Do práce bylo zahrnuto celkem 588 jedinců dvou druhů rodu *Arabidopsis* (*A. lyrata* a *A. arenosa*) a jejich potenciálních hybridů z 26 populací. Jedná se zejména o podrobné sběry potenciálně hybridních rakouských populací v předhůří Alp a následně blízce se vyskytující rodičovské populace (Obrázek 7). Sběry byly provedeny ve třech po sobě jdoucích letech (2016-2018).

Populace byly vytipovány pomocí dostupné literatury, dochovaných herbářových položek ve veřejném herbáři přírodovědného muzea ve Vídni (W) a na základě předchozí práce konzultantky (Schmickl & Koch, 2011). Některé populace byly vytipovány zcela nově na základě znalosti preferovaných stanovišť studovaných druhů a studia družicových snímků přilehlých oblastí ke známým lokalitám.

Každé stanoviště bylo vyfotografováno, souřadnice všech lokalit byly zaměřeny pomocí GPS a byly zaznamenány 1–3 fytocenologické snímky o rozměru 2 x 2 metry. Při snímkování byla použita metodika založená na principech curyšsko-montpelliérské školy (Braun-Blanquet, 1964) s použitím devítistupňové škály pokryvnosti a početnosti (Van Der Maarel & Westhoff, 1973). Také byla řádově odhadnuta velikost populace *Arabidopsis*.

Na každé lokalitě bylo odebráno 10–20 jedinců *Arabidopsis* pro morfometrické analýzy a dalších 10–20 pro cytometrické a molekulární analýzy. K rozdělení rostlin do dvou datových souborů bylo přikročeno z důvodu, že studované rostliny bývají velmi drobné, pokud by z takových rostlin byl odebrán potřebný objem materiálu pro molekulární analýzu, nebylo by na nich již možné provést morfometrickou analýzu. Rostliny byly vybírány tak, aby pokryly celý populací vymezený areál. Byly sbírány náhodně, alespoň metr od sebe, při sběru nebylo přihlíženo k velikosti rostlin, počtu květů, ani k jiným vlastnostem. Populace byly vybírány tak, aby byly od sebe vzdálené nejméně 2-3 kilometry.

2. 2. Molekulární analýzy

Pro molekulární analýzu byla zvolena metoda RADseq (Baird et al., 2008), což je analýza, pomocí níž můžeme získat informace o jednonukleotidových záměnách (single nucleotide polymorphism, SNP) na omezeném rozsahu genomu (pracuje se jen s fragmenty genomu

určené velikosti, fragmenty se získají naštipáním specifickými restrikcčními enzymy). Získané fragmenty byly mapovány na referenční genom *Arabidopsis lyrata* (Hu et al., 2011).

Rostliny pro molekulární analýzu byly odebrány do silikagelu, kdy byla do čajových sáčků odebrána většina listů dané rostliny. Zbylé části rostliny byly založeny jako dokladové herbářové položky, které budou uloženy v herbářích Univerzity Karlovy (PRC) a zůstanou uchovány jako doklad k materiálu v silikagelu.

Vzorky byly zpracovávány v DNA laboratoři Katedry botaniky PřF UK. Byla provedena sorbitolová extrakce DNA (Štorchová et al., 2000) s některými modifikacemi (nejvýznamnější představuje, že rostliny nebyly ukládány do roztoku a před samotnou extrakcí byl pouze sušený rostlinný materiál nadrcen pomocí wolframkarbidových kuliček). Dále byla měřena koncentrace na spektrofotometru Nanodrop (ThermoFisher Scientific) a fluorometru Qubit (ThermoFisher Scientific). Na základě získaných údajů o koncentraci byla DNA naředěna na koncentraci 19ng/μl. Dále byla připravena RADseq knihovna pomocí protokolu double digest RadSeq (Peterson et al., 2012) s některými modifikacemi (Brian Arnold, nepublikovaný materiál), nejvýznamnější modifikací bylo využití jediného restrikcčního enzymu, kterým byl HpyCH4V (NewEngland BioLabs) a následné vytvoření tzv. A-tail overhang, na který se ligovaly adaptory. Knihovna byla osekvenována na platformě Illumina HiSeq 2500 v4 v EMBL Genomics Core Facility, Heidelberg, byl použit kit pro pair end sekvenaci 2x 125 bp.

2. 2. 1. Analýza molekulárních dat

Syrová sekvenační data byla zpracována Vojtěchem Zeiskem (Katedra botaniky PřF UK), který vytvořil filtrovaný *vcf* soubor. Z něho byla na základě počtu namapovaných readů a dle procenta chybějících dat vytvořena kritéria pro další filtr souboru, kdy byly z datového souboru odstraněny rostliny s více jak 90 % chybějících dat a také všechny rostliny, kde počet readů namapovaných na referenční genom *Arabidopsis lyrata* nepřesáhl 500 000. V programu R (v. 3.4.4., The R Foundation for Statistical Computing, 2018) v nástroji Rstudio (v. 1.1.442, RStudio, Inc., 2018) byla s využitím balíčku adegenet (Jombart, 2008) vypočtena analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCA) a byl vytvořen

ordinační diagram. Následovala analýza DAPC, jejíž součástí je K-means clustering (bayesovská shlukovací analýza rozdělující objekty do předem určeného počtu skupin). Dále byla vytvořena matice genetických vzdáleností (podle Neiovy genetické vzdálenosti) za použití balíčku Stamp (Parks et al., 2014). Z matice genetických vzdáleností byl v programu SplitsTree4 (Huson & Bryant, 2006) vytvořena pomocí metody neighbour-joining (Saitou & Nei, 1987). Všechny výše zmíněné analýzy byly provedeny zvlášť pro celý dataset a zvlášť pro tetraploidy.

Podle analýzy DAPC při počtu shluků $K=3$ byly pro tetraploidy vymezeny tři skupiny populací – *Arabidopsis arenosa*, *A. lyrata* a hybridi. Diploidi byli zařazeni do skupiny *A. lyrata* (jiní diploidi rodu *Arabidopsis* se v oblasti nevyskytují). Tyto skupiny byly použity ve všech navazujících analýzách.

2. 3. Cytometrické analýzy

Velmi jednoduchou a rychlou metodu, jak stanovit ploidii jednotlivých rostlin a rostlinných populací, představuje průtoková cytometrie (flow cytometry) (Kron et al., 2007; Doležel et al., 2007). Jedná se o metodu v dnešní době značně rozšířenou, umožňující analýzu velkého počtu rostlin. Nenahrazuje však úplně tradiční karyologické metody, které jsou i v dnešní době jedinou cestou pro zjištění přesného počtu chromosomů. V případě studovaného systému byly takové údaje již k dispozici (databáze BrasiBase (Kiefer et al., 2014)) a nebylo je tedy třeba provést znovu v rámci této práce.

Cytometrické analýzy si kladly dva hlavní cíle – zjištění ploidní úrovně všech populací zahrnutých v práci (což bylo třeba znát pro zpracování RADsex dat) a dále stanovení relativní velikosti genomu pro vybrané populace napříč hybridní zónou. Ke zjištění obou informací byla použita fluorescenční barva DAPI, která se preferenčně váže na A-T báze a proto jsou získané údaje pouze relativní velikostí genomu. Nicméně studie z čeledi Brassicaceae poukazují na téměř dokonalou korelaci hodnot absolutní a relativní velikosti genomu (Marhold et al., 2010a), proto nebylo třeba pro potřeby této práce zařazovat měření absolutní velikosti genomu.

Preferenčně byl pro měření vzorků použit živý materiál, tedy celé živé rostliny, které byly po skončení měření založeny do silikagelu a dále použity v navazující molekulární analýze.

Pokud nebylo možné dovést rostliny včas v čerstvém stavu, aby mohla proběhnout analýza na živém materiálu, byly všechny korunní lístky dané rostliny uloženy do čajového sáčku a usušeny v silikagelu. Z té samé rostliny byly také odebrány listy pro molekulární analýzu. Byla také provedena kalibrace, v rámci níž byly měřeny stejné rostliny jak v čerstvém, tak v sušeném stavu. Porovnání těchto měření neukázalo významnější rozdíl.

Pokud neměly rostliny dostatek korunních lístků, nebyly zařazeny do měření na velikost genomu. Pro měření ploidie byly v takovém případě použity listy, určené primárně pro molekulární analýzu.

Současně (v rámci stejných měření) proběhla analýza ploidní úrovně všech jedinců a dále analýza relativní velikosti genomu vybraných jedinců (viz Příloha 3b). Všechna získaná data byla poté vyhodnocena pomocí programu Partec FloMax 2.4d (Partec GmbH, Münster, Germany) a zanesena do primární tabulky cytometrických dat.

2. 3. 1. Detekce ploidní úrovně

Před samotným měřením byla provedena kalibrace, aby mohla být do jedné analýzy zahrnuta jak měření na čerstvém materiálu, tak měření materiálu ze silikagelu. Pro měření ploidní úrovně byly připraveny buď jednotlivé vzorky, nebo směsné vzorky zahrnující maximálně 3 rostliny z populace pro rostliny, u nichž byl využit materiál z korunních lístků. U rostlin, kde nebyly korunní lístky k dispozici, byly využity mladé listy a vzorky byly zpracovány vždy samostatně pro každou rostlinu.

K malému kousku dotyčného pletiva (cca 0,5 cm² listu nebo 1–4 korunní lístky) byl vždy přidán zhruba stejně velký vzorek standardu a také zhruba 600 µl (pro živý materiál) nebo 650 µl (pro materiál ze silikagelu) pufru Otto I (0,1M monohydrát kyseliny citronové, 0,5% Tween 20; podle protokolu z práce Doležel et al., 2007). Tato směs byla nasekána

v Petriho misce žiletkou a následně přefiltrována do zkumavky přes ústřížek technické tkaniny o velikosti oka 42 µm (Uhelon).

Vzorek byl následně obarven 1 000 µl barvicí směsí podle protokolu (Doležel et al., 2007) složené z pufru Otto II (0,4M Na₂HPO₄·12H₂O), fluorescenčního barviva DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol, 4 µg/ml, Sigma) a merkptoethanolu (2 µl/ml, Sigma). Po ca 5 minutách barvení při pokojové teplotě byl vzorek analyzován na přístroji CyFlow ML (excitační zdroj: UV LED-chip 365 nm), kde byla zaznamenána fluorescence 3 500 jader (nebo 5000, pokud bylo měření zároveň prvním měření na velikost genomu). Všechna měření proběhla na Katedře botaniky PřF UK v Laboratoři průtokové cytometrie. Používaným standardem bylo zpočátku *Solanum pseudocapsicum* (Temsch et al., 2010), což byl standard v rámci Katedry botaniky PřF UK zavedený pro práci s rodem *Arabidopsis*, ale v průběhu měření došlo k výměně standardu za *Carex acutiformis* (Veselý et al., 2012). *C. acutiformis* se pro měření ukázala vhodnější, protože má ve výsledných cytometrických histogramech bližší vzdálenosti ke studovaným druhům než *S. pseudocapsicum*. Všechna provedená měření byla poté přepočítána, aby mohla být k detekci ploidie použita dohromady měření provedená s různými standardy (Tabulka 1).

Tabulka 1. Přepočet měření s různými standardy.

Směsný vzorek <i>Solanum</i> + <i>Carex</i>	Datum analýzy	Průměrná hodnota vzorku	CV vzorku
<i>Solanum</i>	2.5.2017	105.66	2.87
<i>Carex</i>	2.5.2017	268.48	1.93
Poměr <i>Solanum</i> / <i>Carex</i>		0.394	

Přepočet z <i>Carex</i> na <i>Solanum</i>	Průměrná hodnota vzorku * 0.394
Přepočet ze <i>Solanum</i> na <i>Carex</i>	Průměrná hodnota vzorku / 0.394

Pro všechny diploidní populace proběhlo následně ještě jedno kolo měření, kdy byly všechny rostliny změřeny samostatně, aby byly vyloučeny případné výskyty tetraploidních jedinců v diploidních populacích. Na základě známé velikosti genomu diploidů a tetraploidů rodičovských druhů (Hohmann et al., 2014) byla stanovena ploidní úroveň všech jedinců.

2. 3. 2. Měření relativní velikosti genomu

Pro měření relativní velikosti genomu bylo vybráno 17 populací. Tyto populace se nacházely napříč hybridním transektem, zahrnovali jak rodičovské populace, tak hybridní populace s předpokládaným různým stupněm introgrese (informace o zařazení každé populace do příslušné skupiny poskytla molekulární analýzy) (viz seznam populací, Příloha 3a). K měření relativní velikosti genomu byly použity pouze korunní lístky a v rámci populace byly zpracovány veškeré rostliny s dostatečným množstvím korunních lístků (5–15 rostlin na populaci) – pouze u několika málo rostlin byly z důvodu nedostatku korunních lístků použity listy pro část měření. Rostliny byly měřeny třikrát, ve tři různé dny. Jako první měření bylo použito již provedené měření na detekci ploidní úrovně (viz výše) a následující měření byla provedena stejným způsobem. Byly využity buď živé rostliny, nebo rostliny usušené v silikagelu. Bylo provedeno měření na 5000 detekovaných částic.

Poté, co byla dokončena všechna měření, byla vypočtena chyba měření. Pokud se tři jednotlivá měření jednoho jedince navzájem lišila o více než dvě procenta, byly z následujících analýz rostliny vynechány. Po vynechání těchto jedinců zůstalo celkem 117 jedinců (2–13 jedinců na populaci), u nichž byl spočítán průměr ze tří měření a ten byl používán v následujících krocích.

U části rostlin, kde nebyl dostatek materiálu na provedení tří měření, byla použita pouze dvě měření, a následně byla stejným způsobem zpracována.

Pro potřeby dalších analýz byl vypočten populační medián a směrodatná odchylka. Získané mediány byly vyneseny do sloupcového grafu v programu Microsoft Excel 2010 (spolu s chybami měření) a byly také využity v navazujících statistických analýzách.

2. 4. Morfometrická analýza

Pro účely morfometrické analýzy byly připraveny herbářové položky celých rostlin (celkem 342 jedinců ze 24 populací), dále bylo uchováno 5 růžicových listů z každé rostliny separátně v papírové obálce (tímto způsobem byl vždy použit největší růžicový list, nejmenší růžicový list a dále tři průměrně velké listy). Podobným způsobem byl uchováván také druhý stonkový list z nejdelšího stonku (případně z druhého nejdelšího, pokud na nejdelším stonku

nebyl z nějakého důvodu k dispozici). Pro potřeby měření byly listy naskenovány v rozlišení 600 dpi.

Z každé rostliny byl též odebrán nejmladší plně rozkvetlý květ z nejdelšího stonku (případně nejmladší z jiného stonku, pokud předchozí nebyly k dispozici). Květ byl rozebrán na jednotlivé součásti a ty byly průhlednou lepící páskou přilepeny na černou čtvrtku a následně naskenovány s rozlišením 600 dpi.

Byly změřeny celkem čtyři skupiny znaků. Znaky na květech, dále znaky na růžicových listech a druhém stonkovém listu a také znaky na celé rostlině. Poslední datový soubor tvořila data o výskytu různých typů trichomů na různých částech rostliny. Dále byla vytvořena sada poměrových znaků. Seznam všech měřených znaků obsahuje Příloha 4.

2. 4. 1. Analýza morfometrických dat

Získaná matice dat byla podrobena multivariační analýze (Marhold, 2011). K této analýze byly použity programy R (v. 3.4.4., The R Foundation for Statistical Computing, 2018) a Canoco 5 (ter Braak & Šmilauer, 2012). V programu R byla použita sada funkcí MorphoTool (Koutecký, 2015) v upravené podobě vytvořené Markem Šlenkerem z Centra biologie rostlin a biodiverzity SAV (M. Šlenker, nepublikované). S programem R bylo pracováno v rámci platformy RStudio (v. 1.1.442, RStudio, Inc., 2018).

Před samotnou analýzou byly rostliny rozděleny do tří skupin – *Arabidopsis arenosa*, *A. lyrata* a hybridi (stanovených na základě molekulární analýzy). Dále byly v programu R nahrazeny chybějící hodnoty znaků jejich populačními průměry. Z analýzy byly také vyloučeny rostliny, u kterých nebyly naměřeny všechny skupiny znaků (znaky na květech, znaky na významných listech, znaky týkající se trichomů a znaky na celé rostlině). Celkem bylo analyzováno 307 jedinců, z toho 46 jedinců *A. arenosa*, 187 jedinců *A. lyrata* a 74 hybridů.

Byly spočítány základní statistické parametry a dále vytvořeny krabicové diagramy variability každého znaku pro každý ze tří taxonů. Dále byl proveden Shapiro-Wilkův test na normální rozdělení. Na základě jeho výsledku, tj. nepřítomnosti normálního rozdělení ve

všech znacích, byl použit Spearmannův korelační koeficient. Z analýzy byly následně vyřazeny znaky, které byly korelovány s jinými znaky na hladině 90 % a více. Nová matice byla znovu podrobena korelačnímu testu, kdy již žádné znaky, na takové hladině korelované, nalezeny nebyly. Tato matice byla použita v navazujících analýzách.

S cílem získat přehled o celkové morfologické variabilitě sledovaných rostlin byla spočítána analýza hlavních komponent (Principal component analysis, PCA), byly vytvořeny příslušné statistiky a ordinační diagram. V dalším kroku byla ve snaze identifikovat znaky, které nejlépe odlišují rodičovské druhy a hybrida, počítána kanonická diskriminační analýza s pomocí balíčku *candisc* pro všechny tři skupiny (*A. lyrata*, *A. arenosa* a hybridi – skupiny byly stanoveny předem na základě molekulární analýzy), a také zvlášť pro rodičovské taxony. Do histogramu kanonické diskriminační analýzy pro rodičovské druhy byli následně pomocí balíčku *vegan* promítnuti hybridní jedinci.

Dalším krokem byla klasifikační diskriminační analýza. Ta byla provedena pomocí metody křížového ověření (cross validation, one leave out), což je metoda, která postupně propočítává hodnoty pro matici s počtem jedinců $n-1$, kde n je celkový počet jedinců. Program při každém opakování odstraní jednoho jedince ze souboru a snaží se ho zařadit do skupin vytvořených na základě analýzy z matice o velikosti $n-1$. Protože data neměla normální rozdělení, bylo postupováno metodou K-nearest neighbours, ta požaduje stanovení velikosti koeficientu K , který potom používá ve výpočtu. Byla nalezena ideální hodnota $K = 8$, a s tou byl proveden výpočet. Suma všech vypočtených přiřazení do skupin byla zanesena do tabulky.

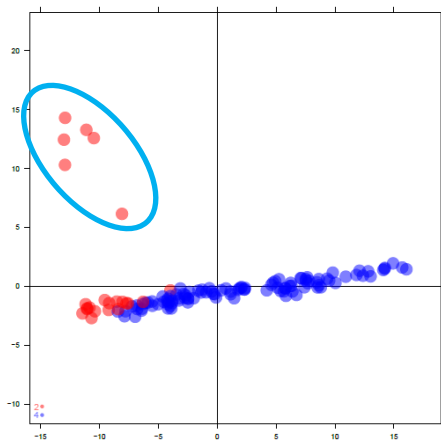
V programu Canoco 5 (ter Braak & Šmilauer, 2012) byla provedena analýza PCA včetně ordinačního diagramu, a ten byl následně doplněn údaji o velikosti genomu nebo průměrné nadmořské výšce populace – tyto údaje byly pasivně promítnuty do ordinačního diagramu pomocí lokální regrese (Macková et al., 2018).

3. Výsledky

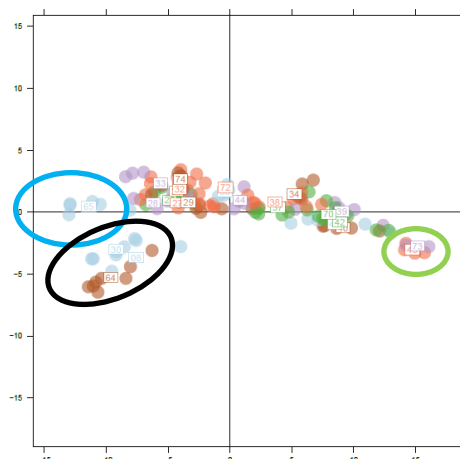
3. 1. Molekulární analýza

Výsledná matice SNP dat po filtraci obsahovala 128 jedinců z 25 populací. Do molekulární analýzy nebyla zařazena populace AL36 (kvůli nedostatku materiálu pro extrakci DNA). Byly spočteny základní charakteristiky matice – obsahovala 128 genotypů, celkem 28 086 bialelických SNPs (single nucleotide polymorphism, jednonukleotidová záměna). Procento chybějících dat v celé matici bylo 33.9 %, tedy 1 218 806 míst.

Byla provedena analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis), která ukázala velký rozdíl mezi první osou (vysvětlila 25,73 % variability) a všemi ostatními (druhá a třetí osa vysvětlily už pouze 3,60 %, respektive 2,17 % variability v datech).



Obrázek 3. Ordinační diagram PCA, podle první a druhé osy. Červeně diploidi, modře tetraploidi. Modrý ovál – populace AL65.



Obrázek 4. Ordinační diagram PCA, podle první a třetí osy. Modrý ovál – populace AL65 (diploid), černý ovál – ostatní diploidi, zelený ovál – populace AL73 a AL43.

Ordinační diagram pro první a druhou osu uspořádal diploidy a tetraploidy (a v rámci tetraplodů oba druhy) podle první osy (Obrázek 3). Podle druhé osy byla oddělena diploidní populace AL65 (St. Vaiteir Staff). Třetí osa oddělila další diploidní populace (AL64, AL30 a AL08) a podle první osy opět populaci AL65 (taktéž diploidní, Obrázek 4). Rozdělení podle

této osy dále částečně kopírovalo geografické rozdělení a dokonce utvořilo na jednom z pólů diagramu samostatnou skupinu pro nejzápadnější populace AL73 a AL43.

Metoda DAPC (discriminant analysis of principal components) za využití metody K-means clustering byla použita k získání různých počtů shluků ($K=2$ a $K=3$). Seznam jednotlivých zařazení všech jedinců je přiložen v přílohách (Příloha 1). Populace byly rozdělovány podle „taxonomické příslušnosti“, nedošlo tedy k očekávatelnému oddělení diploidů a tetraploidů podle první osy při $K=2$, ale došlo k oddělení podle převažující příbuznosti k jednomu či druhému rodiči (příslušné výstupy jsou obsaženy jako Příloha 2). Při rozdělení s $K=3$ došlo k oddělení diploidů jako samostatné skupiny, nedošlo tedy k oddělení potenciálních hybridů jako třetí intermediární skupiny. Pro další analýzu byly tedy diploidi z analýzy vyloučeny.

Pro vyloučení možného vlivu geneticky dobře oddělených diploidů (Obrázek 4) byli tito z dalších analýz molekulárních dat vyloučeni. Další analýza tedy pracovala pouze s tetraploidními jedinci. Tato matice obsahovala 105 jedinců, 28 086 SNPs a 1 044 566 (35,42 %) chybějících dat. Po provedení analýzy hlavních komponent jednotlivé osy vysvětlovaly 22,05 % variability, 1,90 % variability a 1,85 % variability a oddělily od sebe populace přibližně podle jejich geografického rozšíření (další komentář k výsledku analýzy PCA následuje níže).

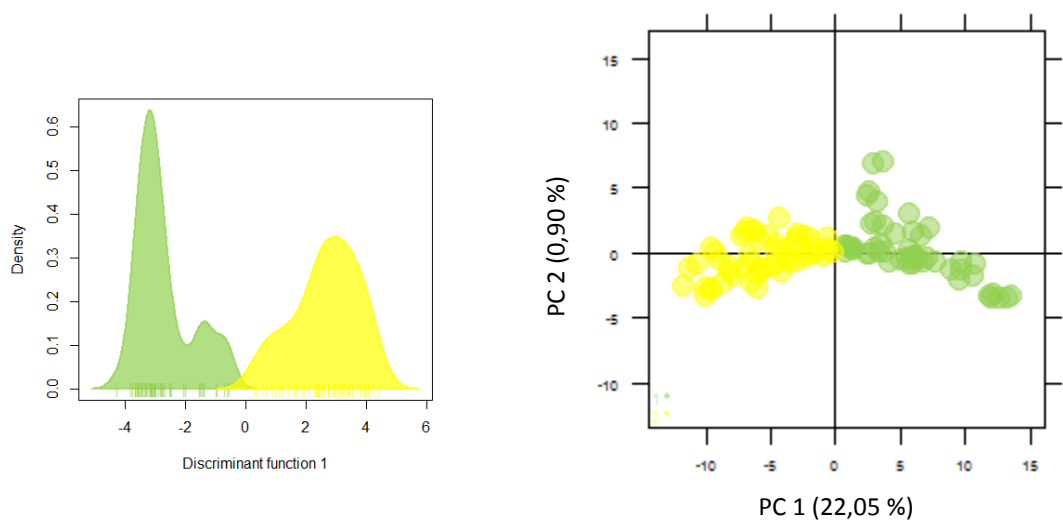
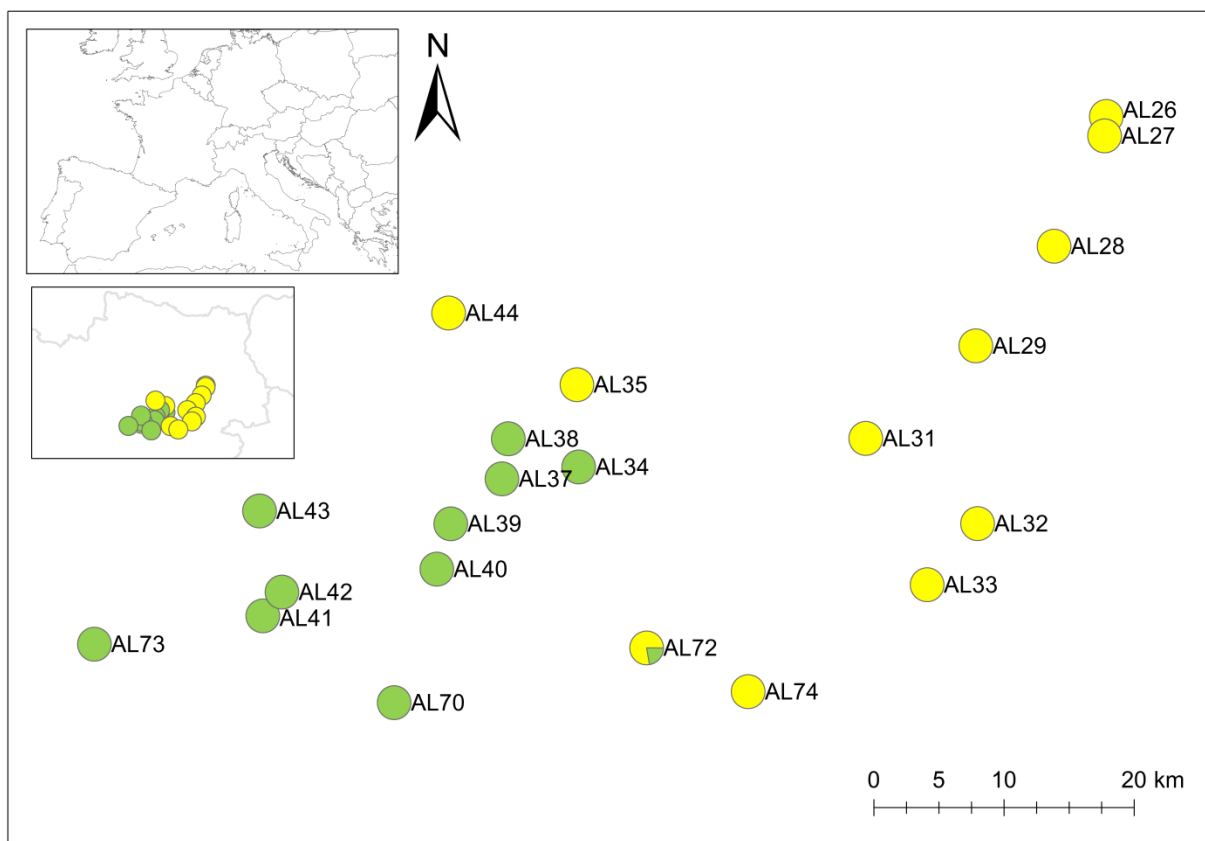
Opět byla použita metoda DAPC k získání různého počtu shluků ($K=2$, $K=3$, $K=4$, $K=5$). Na následujících obrázcích (Obrázky 5a-d) jsou pro jednotlivé hodnoty K přiloženy mapy rozšíření a ordinační diagramy PCA, obojí obarvené podle skupin, do kterých byly rozděleny pomocí DAPC.

Zatímco při vytvoření pouhých dvou shluků došlo k rozdělení všech populací (včetně předpokládaných hybridů) do jednoho z rodičovských druhů (což kopírovalo geografické rozšíření populací), pro $K=3$ vznikla skupina s intermediárním genotypem, která byla umístěna mezi dvěma ostatními skupinami (odpovídající tedy předpokládaným intermediárním hybridům). Při zvyšování počtu skupin vznikal stále podrobnější obraz hybridní zóny, který rozděloval jedince do stále jemnějších kategorií podle předpokládaného stupně introgrese. Tyto skupiny tvořily pásy jak na geografické mapě, tak také na analýze PCA. Populace AL43 a AL73, které byly pozorovatelné jako samostatná skupina při PCA analýze celého datového souboru, se při

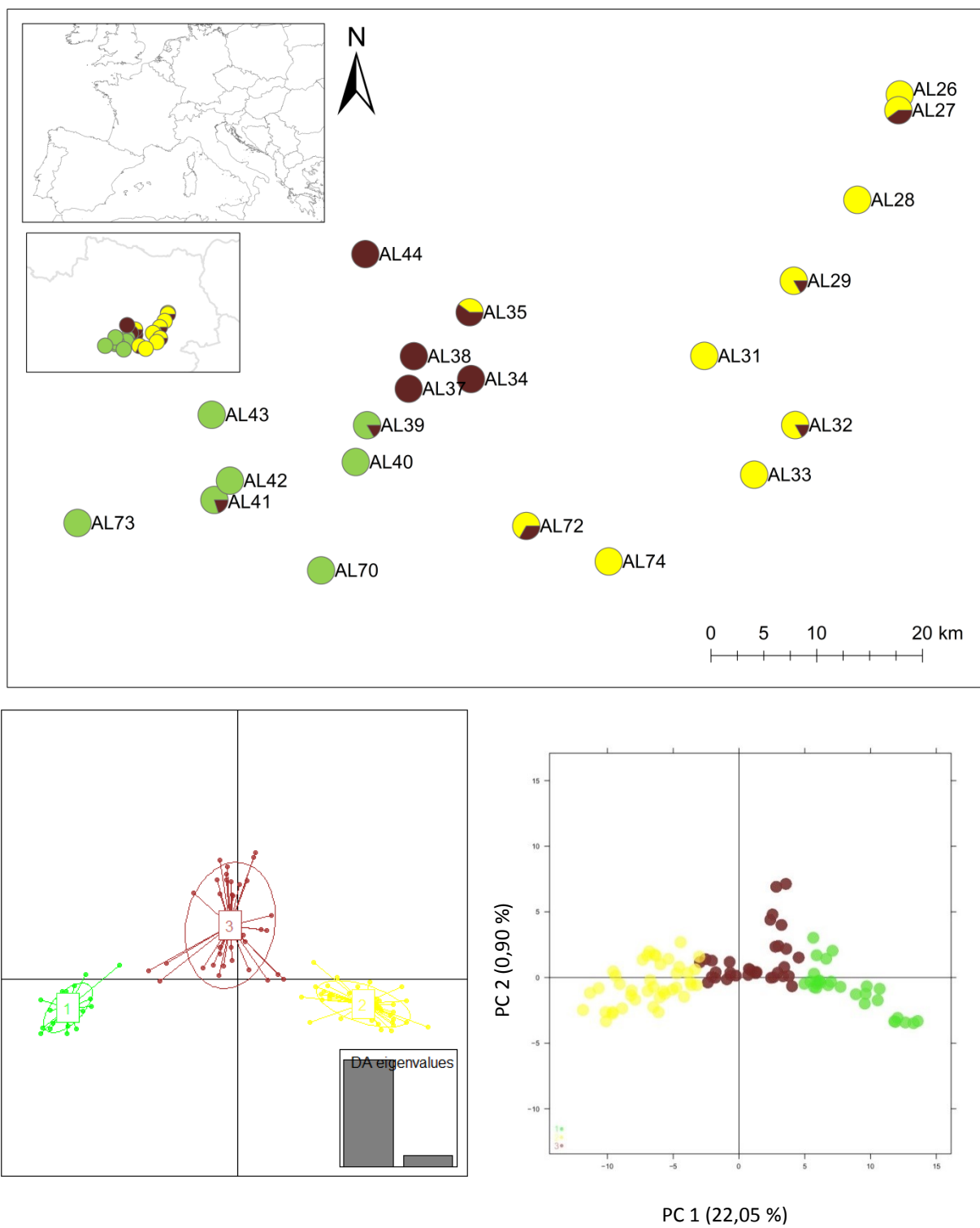
shlukovací analýze ukázaly být jako velmi příbuzné a i při nejjemnějším rozlišení jednoznačně zapadaly do skupiny odpovídající geograficky i geneticky „nejčistší“ linii *A. arenosa*.

Rozdělení do tří skupin nejlépe vyhovovalo potřebám této práce a rozdělení do více shluků nepřinášelo výrazně více informace, proto se dále pracovalo s ním. Populace byly tedy následně přiřazeny do tří skupin, podle převažujícího zařazení jednotlivých jedinců, a byly jim připsány následující kategorie: *A. arenosa*, *A. lyrata* a hybridy (viz seznam populací, Příloha 3a).

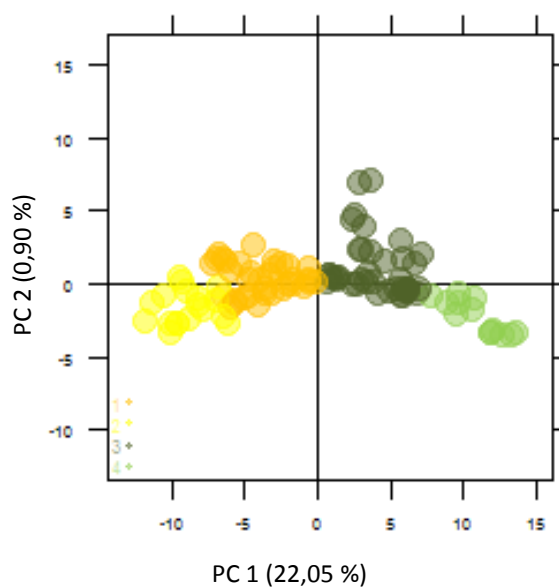
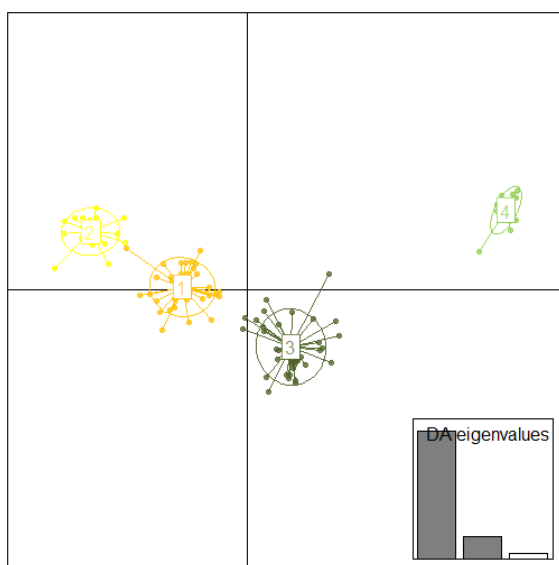
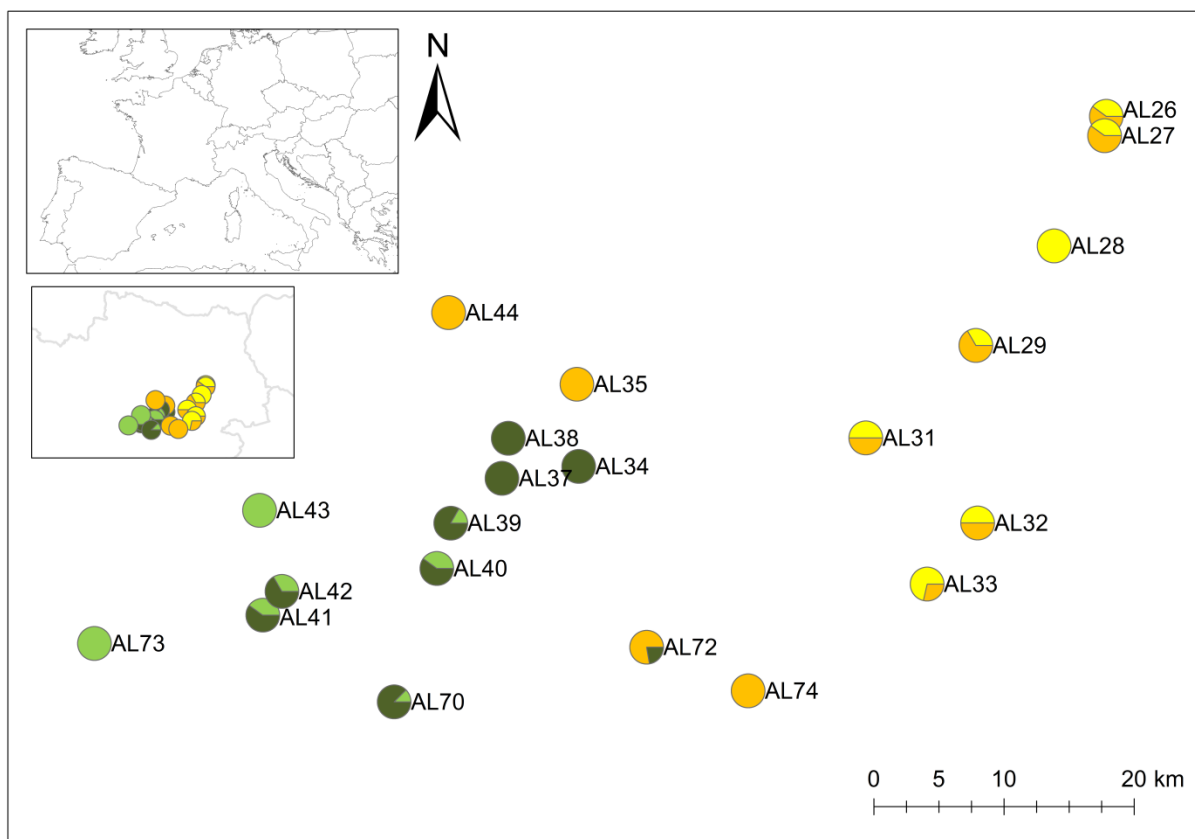
Při analýze matice Neiových genetických vzdáleností (Saitou & Nei, 1987) v programu Splits Tree (Huson & Bryant, 2006) byly vytvořeny dvě neighbour-joining sítě, první pro celý datový soubor, další pouze pro tetraploidy (viz Obrázky 6a, 6b). Obě analýzy prokázaly lineární gradient genotypů, kdy byly mnohem jasněji oddělené jednotlivé populace rodičovských druhů a hybridy tvořili gradient mezi nimi bez jasnějších shluků. Při zařazení diploidů do analýzy se ukázalo, že právě diploidy jsou nejlépe vymezeny v rámci sítě a tvoří jednoznačné skupiny (jak všichni dohromady jednu diploidní větev, tak i jednotlivé diploidní populace navzájem s výjimkou populací AL08 a AL64, které ale nejspíše tvoří metapopulaci, jak naznačuje jejich relativní geografická blízkost).



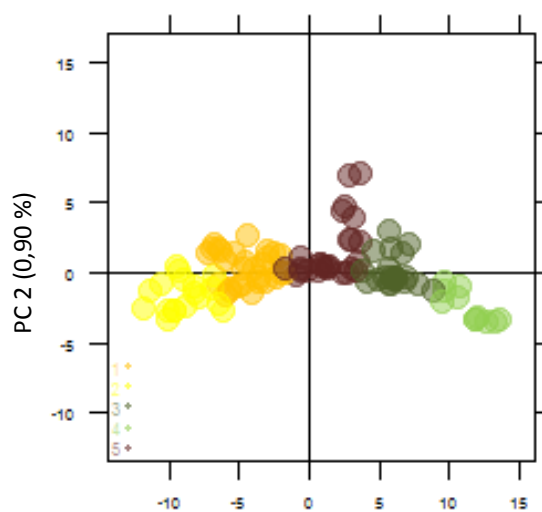
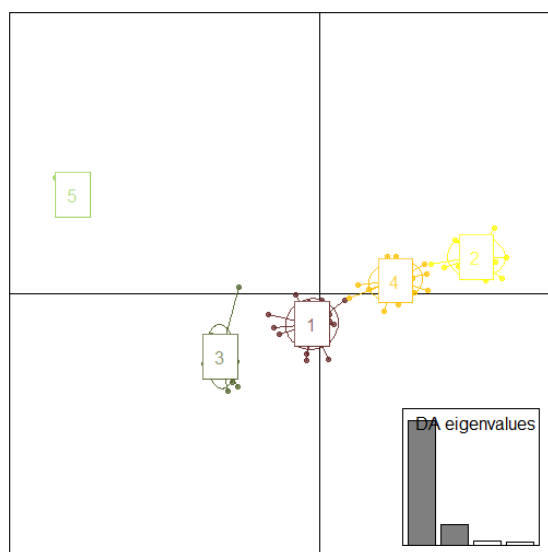
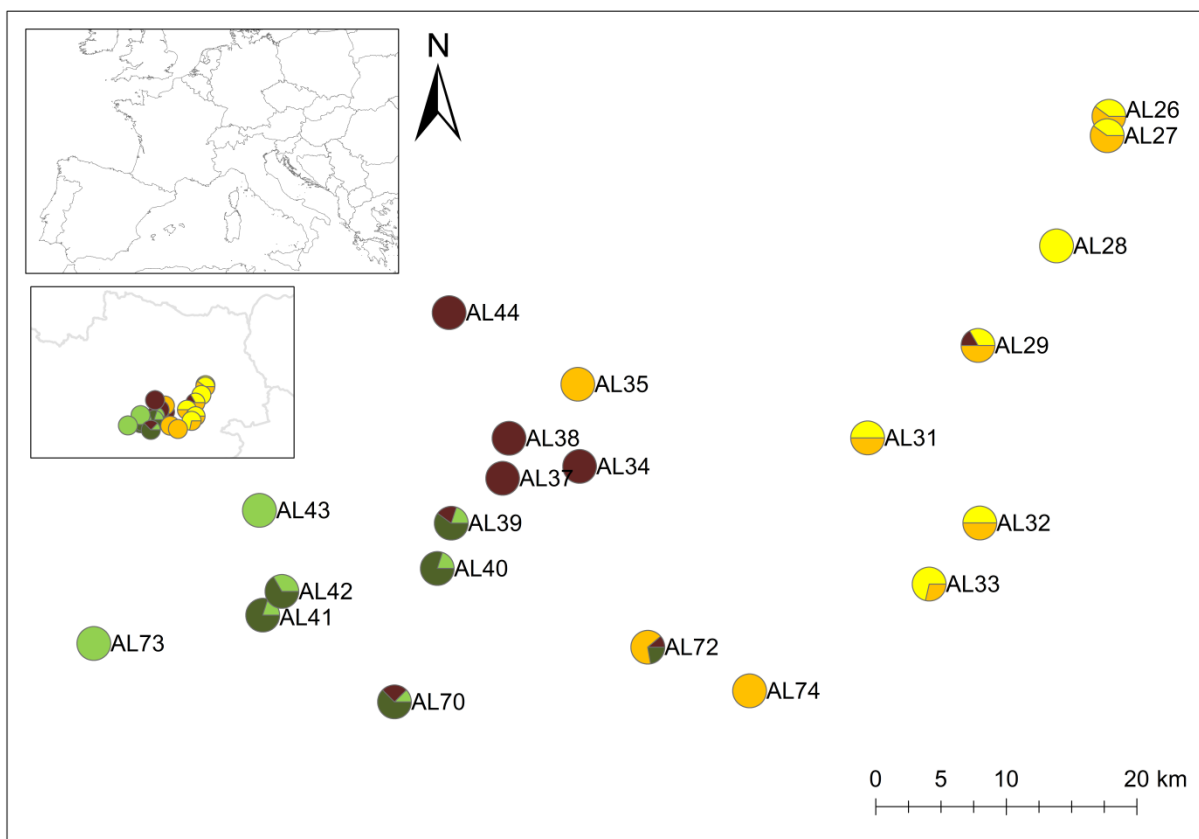
Obrázek 5a. Analýza DAPC, K=2, dva nalezené shluky byly zobrazeny na mapě rozšíření a na diagramu PCA. Zeleně *A. arenosa*, žlutě *A. lyrata*.



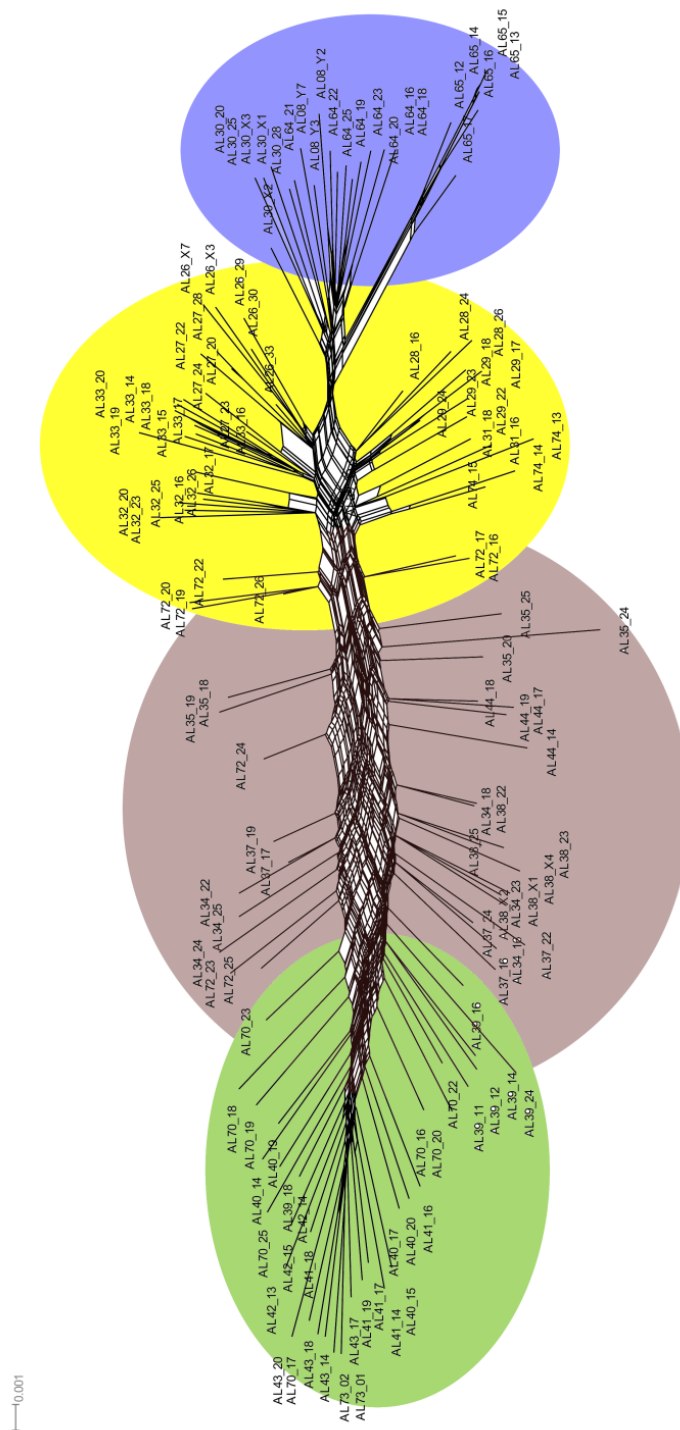
Obrázek 5b. Analýza DAPC, K=3, pouze tetraploidi, tři nalezené shluky byly zobrazeny na mapě rozšíření a na diagramu PCA. Zeleně *A. arenosa*, hnědě hybridy, žlutě *A. lyrata*.



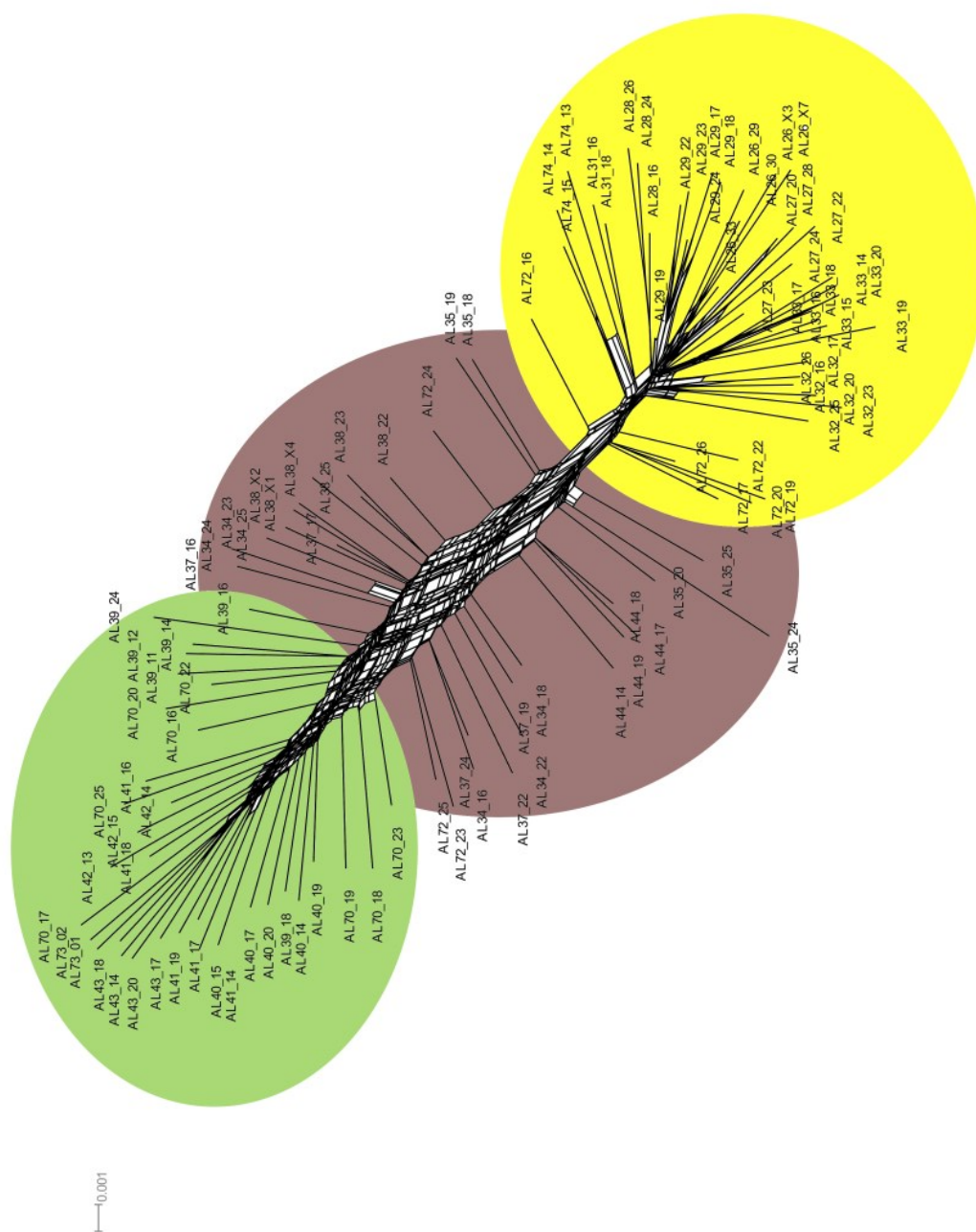
Obrázek 5c. Analýza DAPC, K=4, pouze tetraploidi, čtyři nalezené shluky byly zobrazeny na mapě rozšíření a na diagramu PCA. Zeleně *A. arenosa*, tmavě zeleně introgresanti bližší *A. arenosa*, oranžově introgresanti bližší *A. lyrata*, žlutě *A. lyrata*.



Obrázek 5d. Analýza DAPC, K=5, pouze tetraploidi, pět nalezených shluků bylo zobrazeno na mapě rozšíření a na diagramu PCA. Zeleně *A. arenosa*, tmavě zeleně introgresanti bližší *A. arenosa*, hnědě hybridů, oranžově introgresanti bližší *A. lyrata*, žlutě *A. lyrata*.



Obrázek 6a. Síť vytvořená pomocí metody neighbour-joining pro datový soubor **obou ploidních úrovní**. Na základě matice Neiových vzdáleností. Modře diploidní *A. lyrata*, žlutě tetraploidní *A. lyrata*, hnědě hybridi, zeleně *A. arenosa*



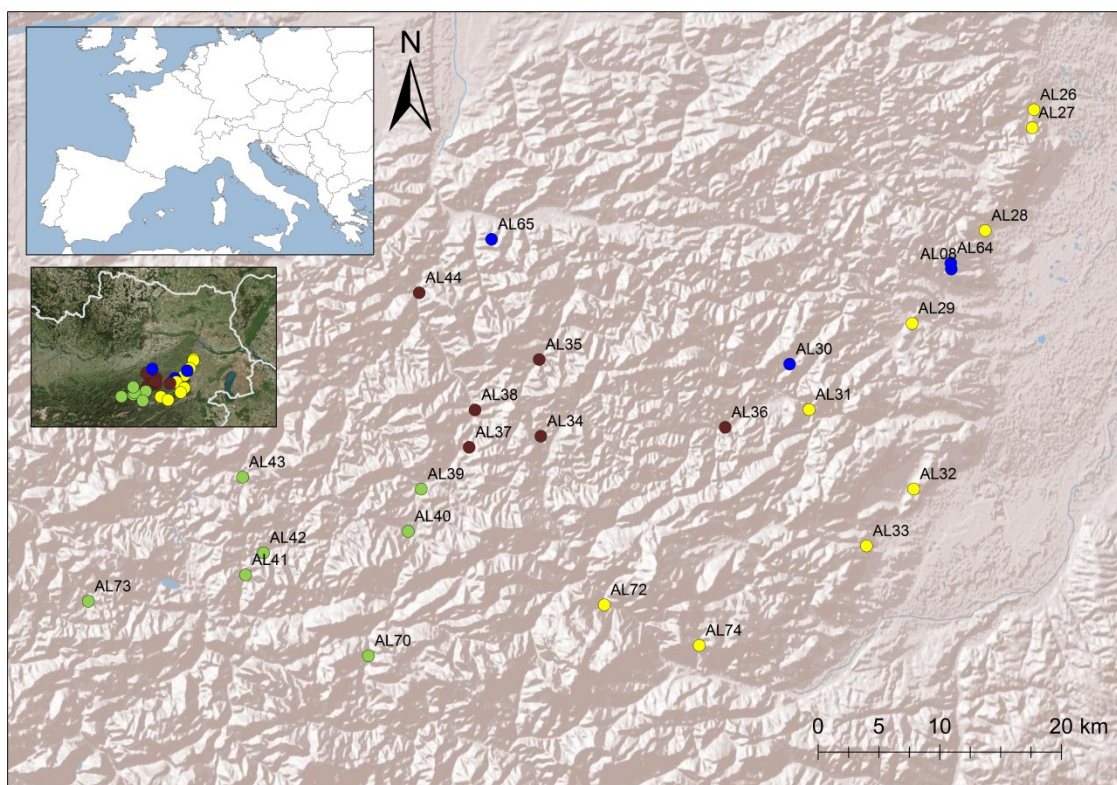
Obrázek 6b. Síť vytvořená pomocí metody neighbour-joining tree pro datový soubor **tetraploidů** (diploidní jedinci byli z analýzy vynecháni) na základě matice Neiových vzdáleností. Žlutě *A. lyrata*, hnědě hybridi, zeleně *A. arenosa*.

3. 2. Cytometrická analýza

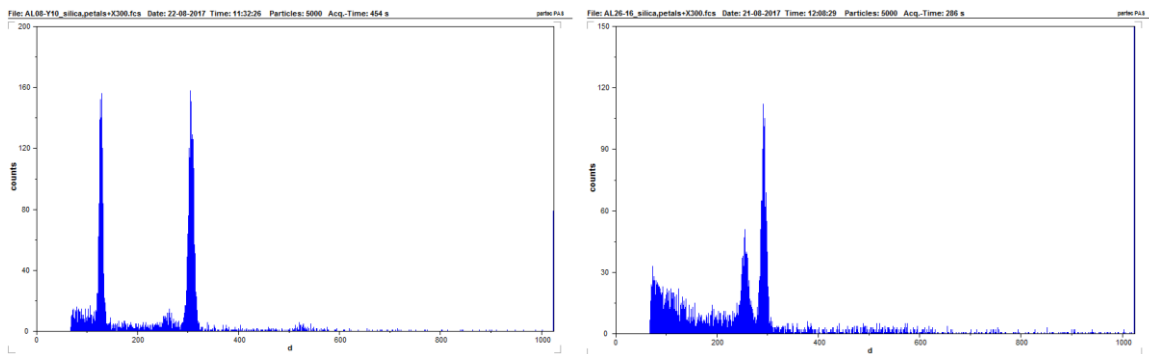
3. 2. 1. Ploidní úrovně

Bylo analyzováno 250 jedinců z 26 populací, které byly rozděleny do skupin (*A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridní rostliny)| na základě předchozí molekulární analýzy.

Analýza ploidie odhalila dvě ploidní úrovně ve sledované oblasti – diploidy a tetraploidy (ploidní úrovně byly vyneseny do mapy, Obrázek 7a, příklady histogramů v Obrázku 7b). Nebyly však nalezeny žádné smíšené populace, kde by se obě ploidní úrovně nacházely pospolu. Naprostá většina populací byla tetraploidní (populace označené na základě molekulárních dat jako *Arabidopsis arenosa*, hybridy a část populací *A. lyrata*), pouze čtyři populace byly diploidní (populace AL08, AL 64, AL 30 – všechny náležící do druhu *A. lyrata*). S výjimkou geograficky izolované populace AL65 (St. Veiter Staff) byly všechny ostatní diploidní populace umístěné na okrajích studované oblasti, bez předpokládané možnosti přímého kontaktu s druhým rodičovským druhem.



Obrázek 7a. Distribuce ploidních úrovní v oblasti. Modře diploidní jedinci *A. lyrata*, žlutě tetraploidní jedinci *A. lyrata*, hnědě tetraploidní hybridy, zeleně jedinci tetraploidní *A. arenosa*.



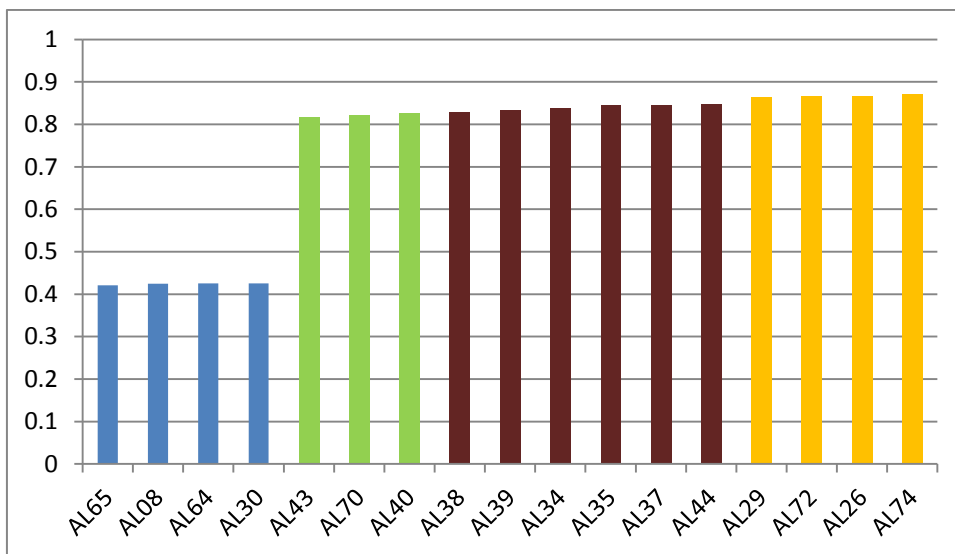
Obrázek 7b. Ukázka histogramů relativní velikosti genomu druhu *Arabidopsis lyrata*. Vlevo diploidní jedinec AL08-90, vpravo tetraploidní jedinec AL26-16.

3. 2. 2. Velikost genomu

V následujícím textu, pokud bude psáno o velikosti genomu, bude myšlena relativní velikost genomu získaná pomocí měření s fluorescenční barvou DAPI. Absolutní velikost genomu nebyla měřena, protože u čeledi Brassicaceae je prokázáno, že absolutní a relativní velikosti genomu jsou velmi silně korelovány (Marhold et al., 2010b).

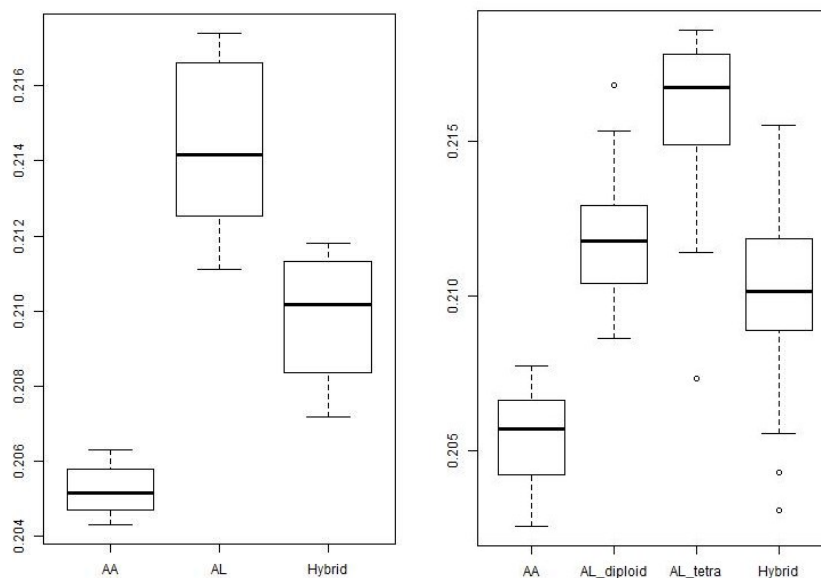
Velikosti genomu, získané jako průměr tří měření provedených v různé dny, byly použity k vypočtení populačního mediánu. Do analýzy bylo zahrnuto 17 populací napříč studovanou oblastí a z každé populace bylo použito 2 - 13 jedinců (viz Příloha 3). Získané hodnoty byly vyneseny do sloupcového grafu a populace byly rozděleny do skupin získaných v rámci molekulární analýzy (Obrázek 8).

Nejmenší velikost genomu měly podle očekávání diploidní populace *Arabidopsis lyrata*. Z tetraploidů měly nejmenší velikost genomu populace *A. arenosa* a největší populace *A. lyrata*. Hybridi byli, co do velikosti genomu, intermediární.



Obrázek 8. Relativní velikost genomu. Modře diploidi *A. lyrata*, zeleně tetraploidi *A. arenosa*, hnědě tetraploidní hybridi, žlutě tetraploidi *A. lyrata*.

Pro potřeby dalších analýz byla vypočítána monoploidní velikost genomu, získaná vydělením průměru pro jedince ploidní úrovně, resp. vydělením hodnot pro tetraploidní jedince dvěma. Z těchto hodnot byl opět spočítán populační medián.

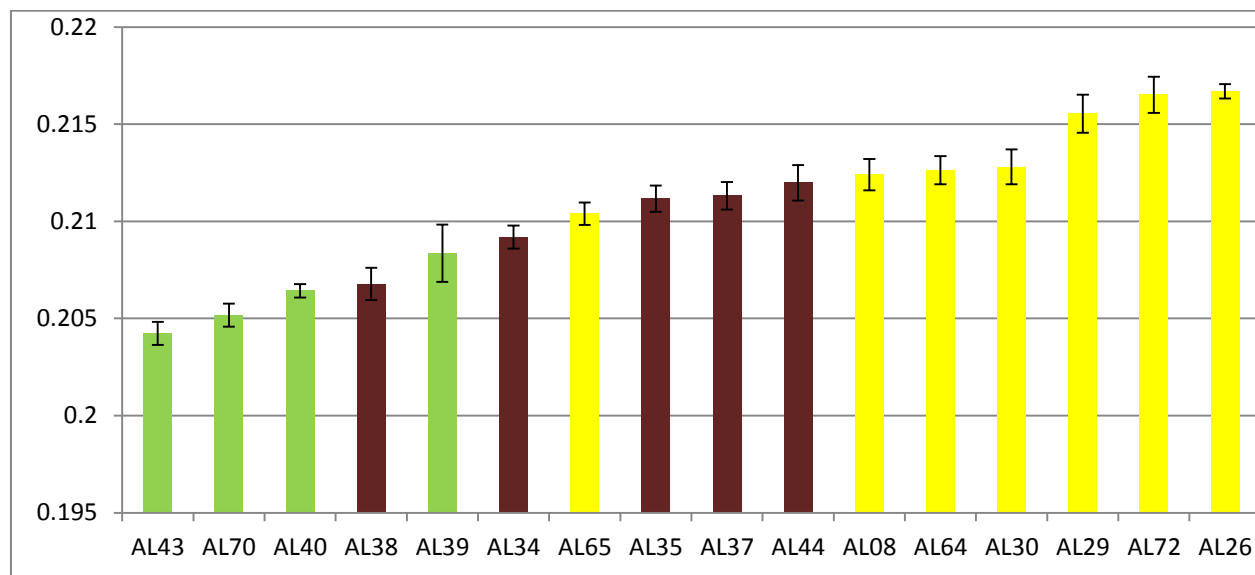


Obrázek 9. Krabicové diagramy s populačními mediány monoploidní velikosti genomu pro každý z taxonů. Vlevo vynesené pro tři skupiny (zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridi), vpravo jsou navíc odděleni diploidi a tetraploidi *A. lyrata* (zleva *A. arenosa*, diploidi *A. lyrata*, tetraploidi *A. lyrata*, hybridi).

Krabicové diagramy s populačními mediány, vytvořené v programu R (Obrázek 9), jasně ukázaly, že všechny tři kategorie jsou bezpečně oddělené na základě monoploidní velikosti genomu. *A. lyrata* má monoploidní velikost genomu značně větší než *A. arenosa*. Hybridi mají intermediární monoploidní velikost genomu, ale bližší k *A. lyrata*. *A. lyrata* je co do monoploidní velikosti genomu značně variabilnější, než *A. arenosa*.

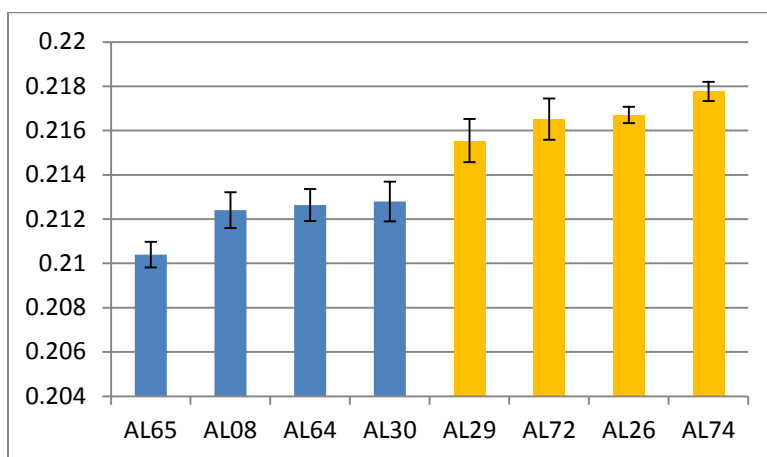
Hodnoty mediánů pro jednotlivé populace byly následně vyneseny do sloupcového grafu (Obrázek 10). Do grafu byla přidána také chyba měření, která v žádné populaci nepřesahuje 0,2 %. Populace byly v grafu seřazeny od nejmenší do největší hodnoty mediánu. Po přiřazení kategorií se ukázalo, že nejmenší monoploidní velikost genomu mají zařazené populace *A. arenosa*, dále hybridi a největší velikost genomu mají populace *A. lyrata*. Populace *A. arenosa* AL40, která je nejbližší k hybridním populacím, k nim má také nejbližší monoploidní velikost genomu (tj. největší ze všech studovaných populací *A. arenosa*).

Jedinou populací narušující více zmíněné zařazení do skupin je populace AL65 (St. Veiter Staff), která má monoploidní velikost genomu menší než ostatní zastoupené populace *A. lyrata* a podle velikosti genomu je tak umístěna v bloku tvořeném hybridními populacemi.



Obrázek 10. Populační medián monoploidní velikosti genomu. Populace jsou seřazeny podle velikosti genomu. Žlutě jsou populace obou ploidních úrovní *A. lyrata*, zeleně *A. arenosa*, hnědě hybridi.

Dále byl sestaven obdobný graf zahrnující pouze populace *A. lyrata* (Obrázek 11). Diploidní populace měly všechny menší monoploidní velikost genomu než tetraploidní populace. Při pohledu na mapu rozšíření těchto populací (Obrázek 7a) se nezdá, že by existovala závislost mezi velikostí genomu a blízkostí populace k populacím hybridů.



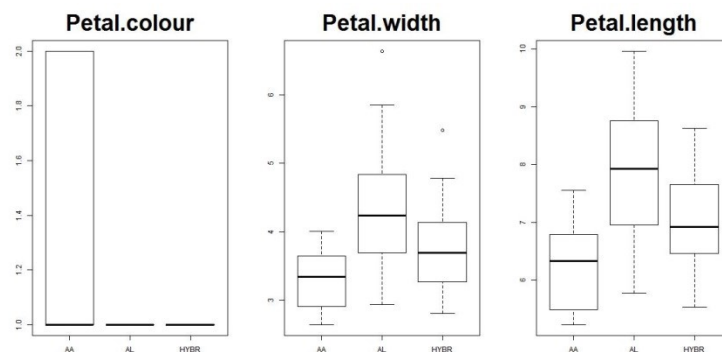
Obrázek 11. Populační medián monoploidní velikosti genomu *A. lyrata*. Modře diploidní populace, žlutě tetraploidní populace.

3. 3. Morfometrická analýza

Morfometrický datový soubor tvořilo celkem 307 rostlin, které byly rozděleny do tří skupin na základě výsledků molekulární analýzy (46 jedinců *A. arenosa*, 187 jedinců *A. lyrata* a 74 hybridů). Bylo hodnoceno celkem 68 znaků a 5 poměrových znaků. Základní statistické parametry byly spočítány v programu R (minimální a maximální hodnota každého znaku, příslušející kvartily, medián, aritmetický průměr) a jsou uloženy v elektronické příloze.

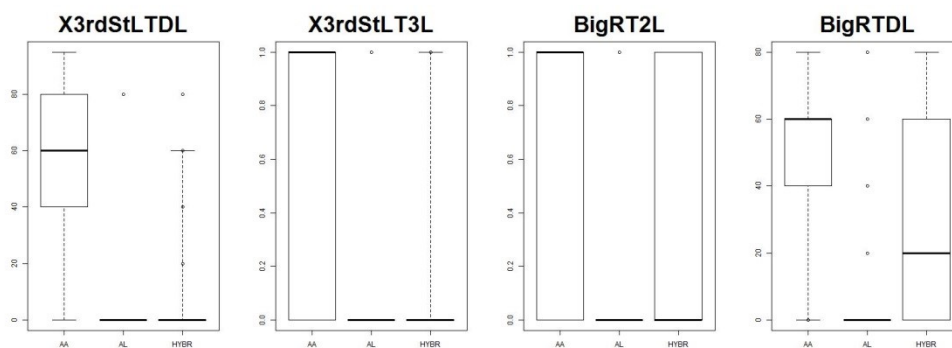
3. 3. 1. Variabilita morfologických znaků napříč skupinami

Hodnoty každého znaku byly vyneseny, pro každou ze tří skupin, do krabicového diagramu a vybrané krabicové diagramy budou nyní komentovány (Obrázky 12-16). Jsou to zejména znaky související s původním morfologickým vymezením rodičovských taxonů a dále krabicové diagramy, které ukázaly značnou míru variability mezi skupinami.

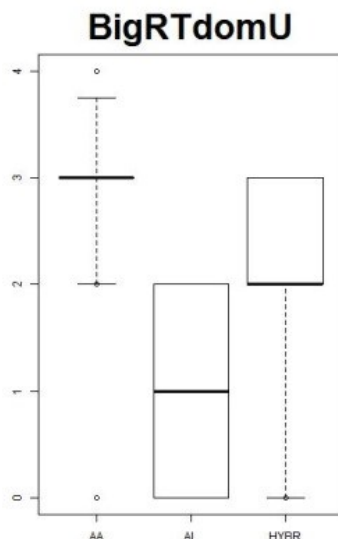


Obrázek 12. Krabicové diagramy vybraných znaků korunních lístků. Zleva: Barva korunních lístků, šířka korunního lístku, délka korunního lístku. Na každém z diagramů: zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridy.

Analýza velikosti korunních lístků ukázala, že *A. lyrata* má největší korunní lístky ze studovaných skupin, *A. arenosa* má korunní lístky znatelně menší a hybridy jsou v tomto znaku intermediární. Co se týče barvy korunních lístků, tak jediný druh u kterého byly pozorovány jiné než bílé korunní lístky je *A. arenosa*, kde byly zaznamenány korunní lístky růžové barvy. I zde ovšem bílé korunní lístky převažovaly (Obrázek 12).



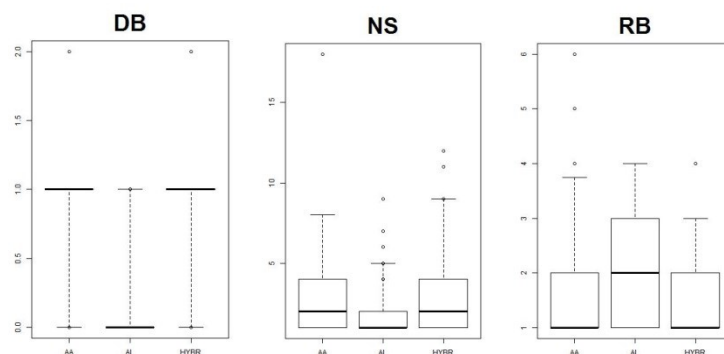
Obrázek 13. Znaky na trichomech. Zleva: Hustota trichomů na třetím stonkovém listu; četnost trifurkáttních trichomů na třetím stonkovém listu; četnost vidličnatých trichomů na největších růžicových listech; hustota trichomů na největších růžicových listech. Na každém z diagramů: zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridy.



Obrázek 14. Krabicový diagram variability znaku BigRTdomU (převládající typ trichomu na největších růžicových listech (adaxiální strana)). Zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridy.

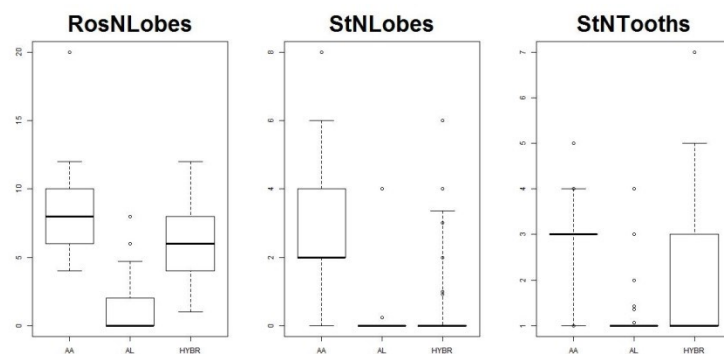
Analýza znaků na trichomech potvrdila dříve používané určovací znaky (Obrázek 13) – *A. lyrata* má s převážnou většinou jednoduché trichomy na celé rostlině, která je obecně méně ochlupená, zatímco rostliny *A. arenosa* jsou chlupatější a mohou se u ní nacházet i složitější větvené trichomy..

Na růžicových listech *A. arenosa* většinou převažují trifurkáttní trichomy (výjimečně i tetrafurkáttní), které u *A. lyrata* téměř nenajdeme a na růžicových listech u tohoto druhu převažují jednoduché trichomy (Obrázek 14). Hybridy jsou v tomto znaku až učebnicově intermediární a převažují u nich difurkáttní trichomy. Přítomnost trifurkáttních a složitějších trichomů tak byla potvrzena jako určovací znak pro druh *Arabidopsis arenosa*. Přítomnost jednoduchých trichomů naopak ve většině případů ukazuje na jedince *A. lyrata*.



Obrázek 15. Znaky životního cyklu na krabicových diagramech variability DB (stupeň větvení hlavního stonku), NS (počet stonků) a RB (úroveň větvení kořene odvozená na základě počtu kořenových nodů). Na každém z diagramů: zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridy.

Znaky životního cyklu (life history) potvrdily převážnou annualitu u rostlin *A. arenosa* i hybridů, zatímco u *A. lyrata* (kde bylo kořenových nodů většinou více), naznačuje, že rostliny jsou převážně dvouleté, případně víceleté. Co se tendence ke tvorbě bočních větví stonku týče, *A. arenosa* i hybridy častěji tvoří boční větve na stonku a častěji mají i více stonků, zatímco u *A. lyrata* mají rostliny většinou jeden hlavní stonek, který není větvený. To vše ukazuje na významnější roli apikální dominance u *A. lyrata*.



Obrázek 16. Krabicové diagrame variability znaků na listech. Zleva: počet laloků největšího růžicového listu, počet laloků druhého stonkového listu, počet zubů druhého stonkového listu. Na každém z diagramů: zleva *A. arenosa*, *A. lyrata*, hybridy.

Analýza význačných listů (největší růžicový list, druhý stonkový list, Obrázek 16) ukázala nepřekvapivý trend u *A. arenosa* k větší dělenosti obou významných listů. U *A. lyrata* (zcela v souladu s dosud užívanými určovacími znaky) nebyly zaznamenány dělené druhé

stonkové listy, které byly přítomny u většiny jedinců *A. arenosa*. U hybridů také převažovaly druhé stonkové listy typu *A. lyrata* (tedy nedělené), ale dělené listy se výjimečně vyskytovaly s větší frekvencí než u *A. lyrata*.

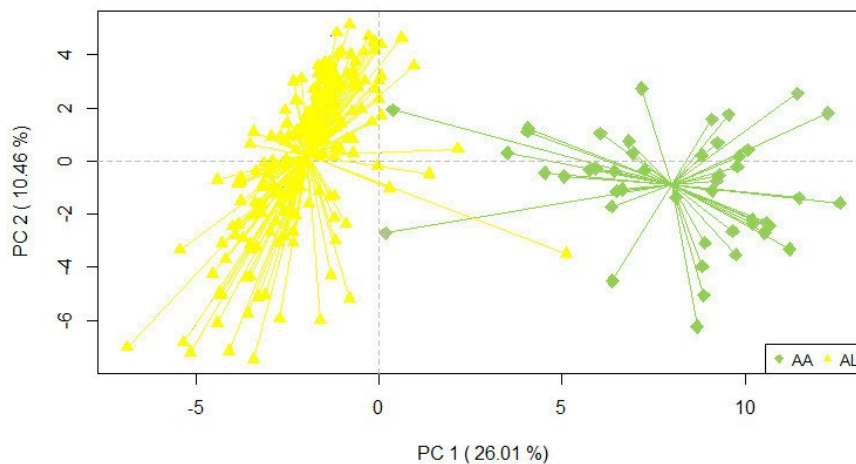
Pokud byly místo laloků druhého stonkového listu (zářezy hloubky alespoň 50% vzdálenosti od nejširšího okraje listu ke středové žilce), sledovány i zuby (mělčí zářezy), pak se u *A. lyrata* taktéž nevyskytovaly, zatímco u hybridů byly poměrně časté.

3. 3. 2. Test normality a test na přítomnost korelovaných znaků

Datový soubor byl podroben Shapiro-Wilkově testu normality. Protože data neměla normální rozdělení v žádném ze sledovaných znaků, byl použit Spearmanův korelační koeficient. Na základě jeho výsledků byly z matice odstraněny znaky vysoce korelované (na hladině 90 % a více) s jinými znaky, dále tedy bylo pracováno s maticí obsahující jen 73 znaků. Vyřazené znaky jsou vyznačeny v seznamu všech znaků v Příloze 4.

3. 3. 3. Analýza hlavních komponent

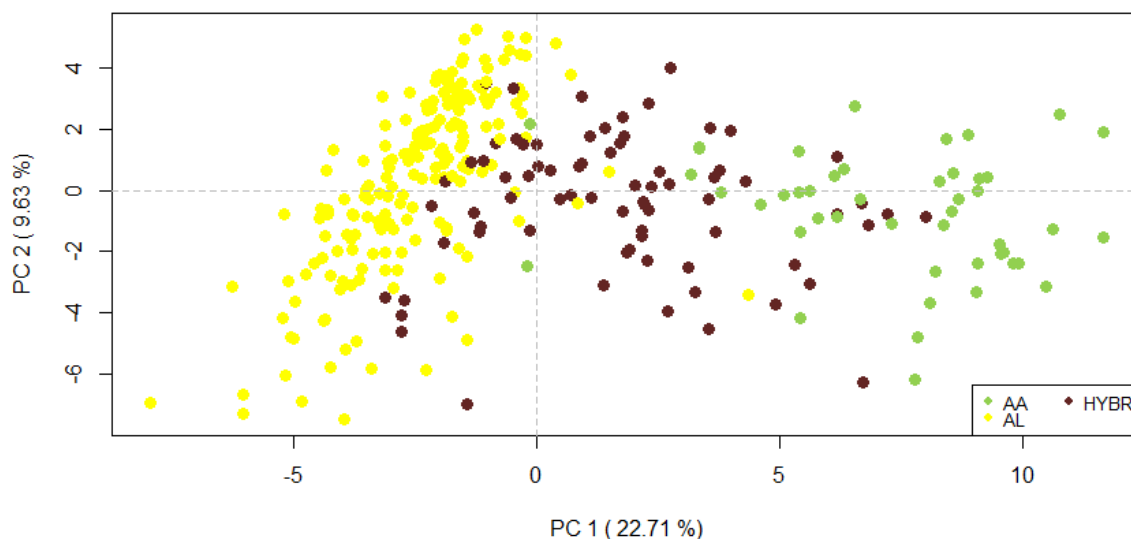
Následovala analýza hlavních komponent (PCA, principal component analysis. Ta byla spočítána nejdříve pouze pro rodičovské druhy. V rámci ní byl nejprve vytvořen ordinační diagram (Obrázek 17). Každá ze skupin vytvořila samostatný shluk a jednotlivé shluky byly od sebe zřetelně odděleny podle první osy, která vysvětluje 26,01 % přítomné variability.



Obrázek 17. Ordinační diagram analýzy hlavních komponent pro jedince *A. lyrata* (žlutě) a *A. arenosa* (zeleně).

Nejvíce k oddělení skupin podle první osy přispěly znaky na trichomech, konkrétně znaky FlowBT1, BigRT3L, X3rdStLTDL, BigRTDL. Významné hodnoty vlastních vektorů ale byly zaznamenány i u znaků StNTooths a StNLobes, které jsou analogy tradičního určovacího znaku (dělenost x nedělenost druhého stonkového listu).

Po provedení totožné analýza pro všechny tři skupiny (Obrázek 18) se situace stala složitější, hybridy byli volně rozptýleni mezi shluky rodičovských druhů. Někteří z nich byly fenotypicky intermediární, jiní měli blíže k jednomu z rodičů.



Obrázek 18. PCA morfologických znaků pro jednotlivé jedince. Žlutě populace obou ploidních úrovní *A. lyrata*, hnědě hybridy, zeleně *A. arenosa*.

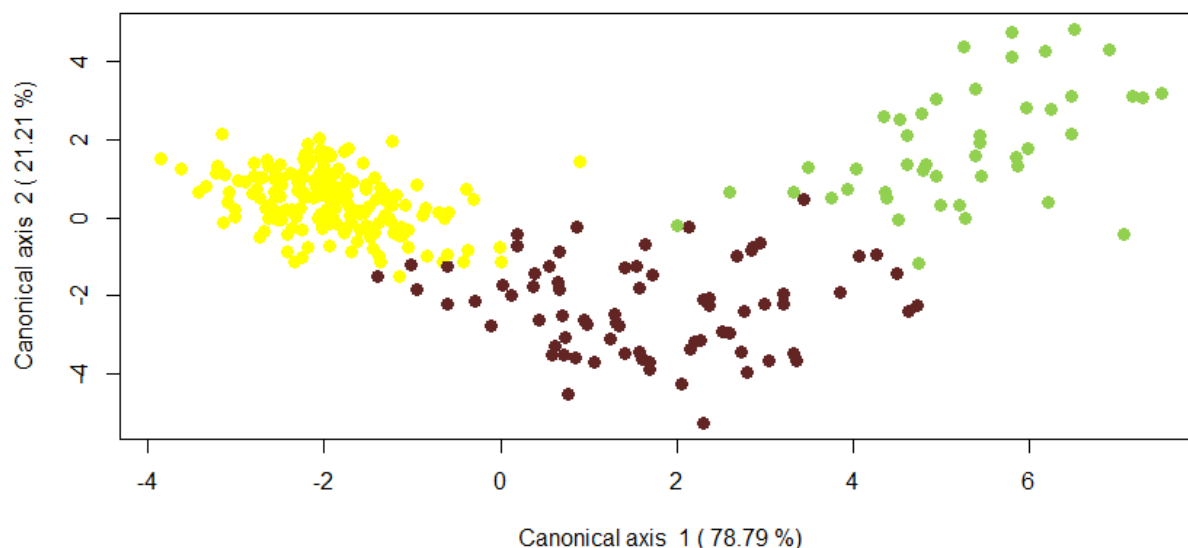
I v analýze všech tří skupin byly skupiny rozdělené převážně podle první osy, která vysvětluje 22,71 % přítomné variability (Obrázek 18). Opět hrály roli zejména znaky na trichomech – BigRTDL, FlowBT1, X3rdStLTDL a BigRT3L. Významný se ukázal také poměrový znak StLTerL/StNTooths, který je opět jednou z cest, jak vyjádřit dělenost druhého stonkového listu.

V obou analýzách se *A. arenosa* ukázala morfologicky mnohem variabilnější oproti *A. lyrata*. Nejvariabilnější ale byli samozřejmě hybridy, kteří se na obou pólech ordinačního diagramu značně překrývali s rodičovskými druhy. Hodnoty vlastních čísel, vlastních vektorů a další charakteristiky provedených analýz PCA jsou obsaženy v přílohách (Příloha 5).

3. 3. 4. Kanonická diskriminační analýza

Pro identifikaci znaků, které nejlépe odlišují tři skupiny od sebe, jsme použili kanonickou diskriminační analýzu (CDA, canonical discriminant analysis). Při analýze pro všechny tři skupiny (Obrázek 19) se jako nejdůležitější znaky, pomáhající rozdělit skupiny po směru první kanonické osy, ukázaly znaky na největším růžicovém listu (RosLT

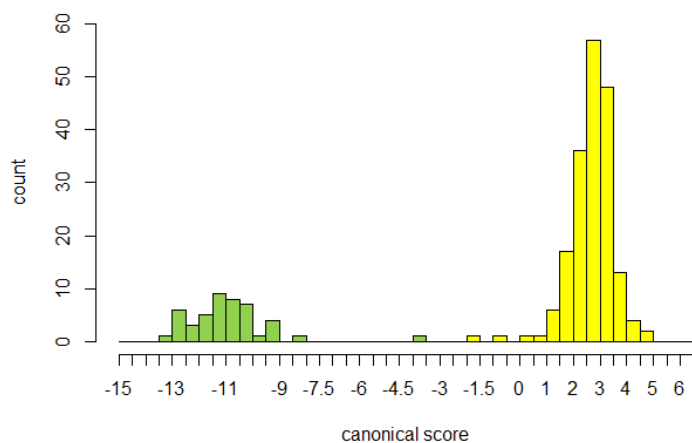
RosLTerL/RosLWtererL.RosLWter, RosLCelkovaDelkaListuBezRapiku/PocetLaloku+1), dále znaky na druhém stonkovém listu (StLTerL/StLWter), na okvětních listech (Petal.length) a dále znaky na trichomech (viz statistika CDA v Příloze 6). První kanonická osa vyjadřuje 78,79 % celkové meziskupinové variability, druhá kanonická osa 21,21 %.



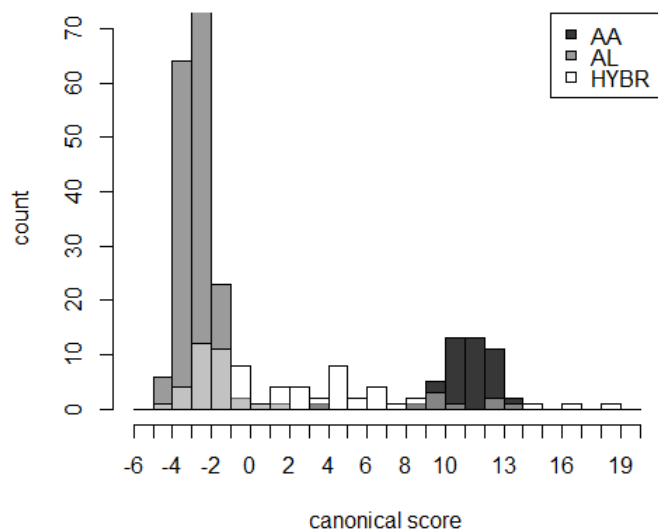
Obrázek 19. Kanonická diskriminační analýza morfologických znaků. Žlutě populace obou ploidních úrovní *A. lyrata*, hnědě hybridy, zeleně *A. arenosa*.

Při provedení kanonické diskriminační analýzy pro oddělení dvou rodičovských skupin hrály roli znaky na trichomech a druhém stonkovém listu (Obrázek 20a, viz hodnoty vlastních čísel v Příloze 6). Pokud byli do získaného histogramu pasivně promítnuti hybridní jedinci (Obrázek 20b), rozvrstвили se na celé škále od rodičovských druhů, ale nejvíce přesně mezi nimi. Byl také pozorován značný překryv hybridů s *A. lyrata*.

Studované znaky se ukázaly jako dobře použitelné pro bezpečné odlišení rodičovských druhů. Odlišení hybridů není tak triviální, jako u rodičovských druhů, ale mělo by být s použitím uvedených znaků, alespoň u některých populací možné. Komplikací může být značná podobnost některých hybridních jedinců s *A. lyrata* a také obecně velká fenotypová plastičnost druhu *A. arenosa*.



Obrázek 20a. Kanonická diskriminační analýza pro rodičovské druhy. Zeleně *A. arenosa*, žlutě *A. lyrata*.



Obrázek 20b. Kanonická diskriminační analýza pro rodičovské druhy. Do obrázku byli navíc pasivně promítnuti hybridní jedinci.

3. 3. 5. Klasifikační diskriminační analýza

Při provedení neparametrické klasifikační diskriminační analýzy metodou křížového ověření (koeficient $K=8$) byly jedinci s velkou pravděpodobností zařazeni zpět do svého původního taxonu (tabulka 2). Nejúspěšnější bylo toto opětovné zařazení u druhu *A. lyrata*, kdyby bylo zpět jako *A. lyrata* klasifikováno 185 jedinců ze 187. U druhu *Arabidopsis arenosa*

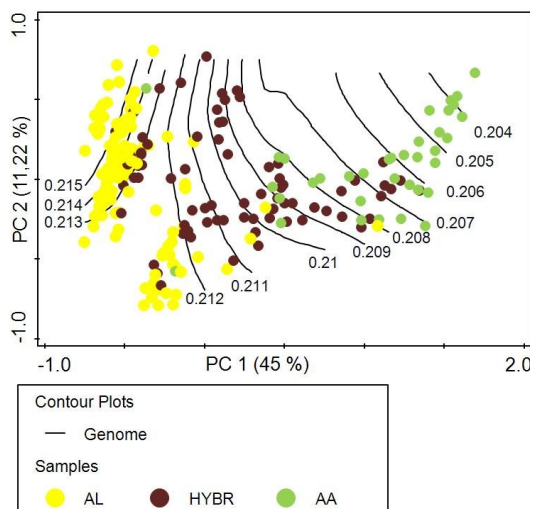
byla úspěšnost jen 76,09 %, nezanedbatelná část jedinců byla klasifikována jako hybridů (9 jedinců ze 46). Hybridní jedinci byli s úspěšností 67,57 % zařazeni zpět do hybridní skupiny, ale 16 jedinců (tedy zhruba pětina jedinců) bylo chybně zařazeno do skupiny *A. lyrata* a jen 8 jedinců do skupiny *A. arenosa*. To podporuje plně výsledky předchozích analýz, které naznačují fenotypový překryv *A. lyrata* s hybridy a dále to podtrhuje skutečnost značné fenotypické plasticity *A. arenosa*. Celkem bylo správně zařazeno 87,95 % jedinců (270 jedinců z celkových 307).

Tabulka 2. Klasifikační diskriminační analýza

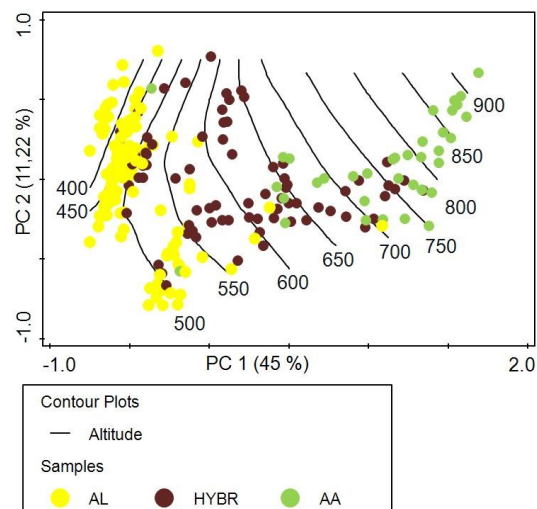
Taxon	<i>A. arenosa</i>	<i>A. lyrata</i>	hybridy	Celkový počet jedinců	% správně zařazených
<i>A. arenosa</i>	35	2	9	46	76.09 %
<i>A. lyrata</i>	1	185	1	187	98.93 %
Hybridy	8	16	50	74	67.57 %
Všichni jedinci	44	203	60	307	87.95 %

3. 3. 6. Shoda analýzy morfologických znaků s výsledky ostatních analýz

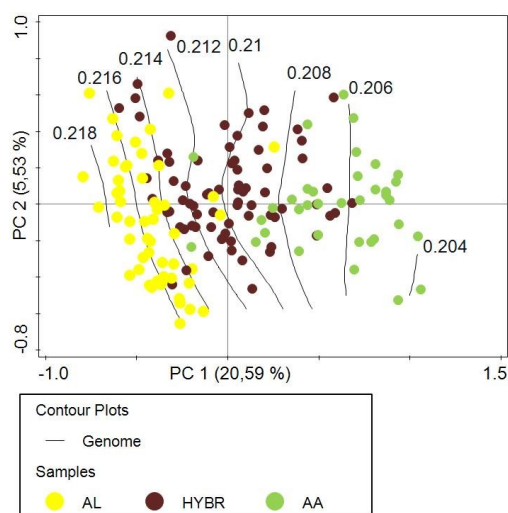
Analýza v programu Canoco kombinovala analýzu PCA a pasivní promítnutí lokální regrese (model LOESS). Všechny promítané faktory (průměrná populační monoploidní velikost genomu, průměrná altituda populací, průměrná hodnota populačních PCA koordinát z matice SNP dat) se zdají být korelované podle první osy s PCA analýzou morfologických dat, bez ohledu na to, zda je vytvořena matice PCA morfologických dat pro celý datový soubor (Obrázek 21), či pouze pro tetraploidy (Obrázek 22). Pro analýzu korelace hodnoty PCA koordinát SNP dat byla použita PCA analýza pouze tetraploidních jedinců, ve snaze vyloučit vliv ploidní úrovně, který je znatelný při PCA analýze SNP dat pro celý datový soubor (viz výše, Obrázek 22c).



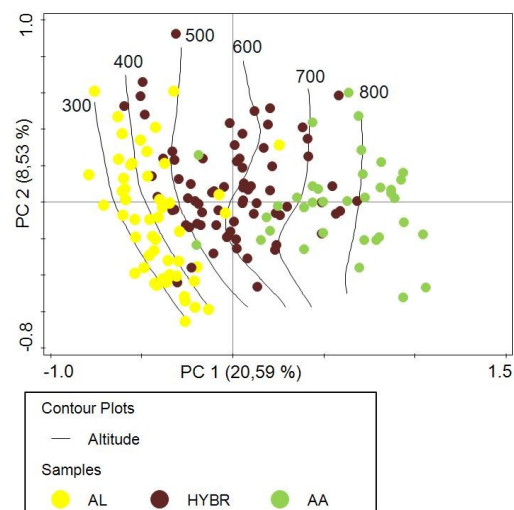
Obrázek 21a. Shoda monoploidní velikosti genomu a PCA morfologických dat pro celý datový soubor.



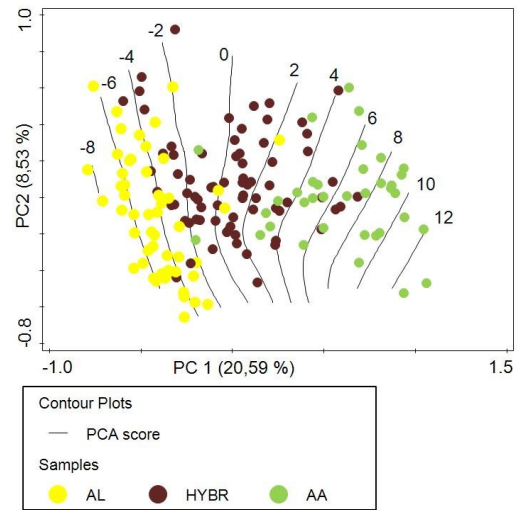
Obrázek 21b. Shoda nadmořské výšky a PCA morfologických dat pro celý datový soubor.



Obrázek 22a. Shoda velikosti genomu a PCA morfologických dat pro datový soubor tetraploidů.



Obrázek 22b. Shoda nadmořské výšky a PCA morfologických dat pro datový soubor tetraploidů.



Obrázek 22c. Shoda PCA koordinát analýzy SNP dat a PCA morfologických dat pro datový soubor tetraploidů.

4. Diskuze

4. 1. Genetická struktura studovaného systému

Práce přináší nejpodrobnější molekulární analýzu populací studovaných druhů z oblasti. Díky velkému počtu zastoupených jedinců a velkému množství zastoupených populací, přináší velmi detailní vhled do distribuce genotypů v regionu.

Práce potvrdila jednu z výchozích hypotéz, a sice existenci gradientu genotypů v oblasti. Značný význam introgrese pro evoluci druhů v oblasti byl prokázán už pomocí mikrosatelitových dat a na základě analýzy plastomu (Schmickl & Koch, 2011, Hohmann & Koch, 2017) a tato práce jej prokázala na základě analýzy velkého množství bialelických SNP dat. Rodičovské druhy mají nejodlišnější genotypy a mezi nimi se nachází různé stupně hybridů, od hybridů intermediárních co do genotypu, až po různé stupně introgrese bližší k jednomu či druhému z rodičů.

To potvrdila analýza DAPC, která při první analýze s předdefinovaným počtem dvou skupin oddělila rostliny do shluků, které přibližně odpovídali rodičovským druhům (a to jak při analýze celého datového souboru, tak při analýze pouze tetraploidních jedinců). Při zvýšení počtu skupin na 3 se u analýzy tetraploidů objevila třetí, významná skupina, která obsahovala jedince s intermediárním genotypem. Při navyšování počtu skupin analýza tetraploidů oddělovala plynule další a další skupiny, které se smysluplně promítaly jak do analýzy PCA SNP dat, tak do mapy rozšíření. Regionem tedy prochází genetický gradient, který velmi významně reflektuje geografii, dochází tu k introgresi na velké škále a většina populací je introgresí ovlivněná. S přihlédnutím k současnému taxonomickému pojetí systému jsem se rozhodl dál v práci používat skupiny vymezené při shlukování do tří skupin, tedy dvě skupiny pro rodičovské druhy a další, třetí, skupinu pro hybridy.

Při použití $K=3$ u celého datového souboru (diploidi i tetraploidi) došlo k oddělení opět do dvou skupin, podobně jako při $K=2$, ale navíc byli odděleni diploidi. To můžeme považovat za důkaz jisté genetické izolace diploidů od tetraploidních populací *A. lyrata*. Signál oddělující ploidní úrovně od sebe je výraznější, než signál gradientu introgrese oddělujícího rodičovské druhy mezi sebou.

4. 2. Polyploidizační událost u *A. lyrata*

PCA analýza s přehledem oddělila diploidní populace od ostatních, diploidi byli odděleni jako samostatná skupina také při shlukovací analýze celého datového souboru (pro $K=3$) a z pohledu na dendrogramu je také zřejmá větší divergence mezi diploidními populacemi - což je pochopitelné, pokud diploidní populace uvažujeme jako starší, izolovanější a navíc neúčastníci se genového toku s *A. arenosa*, který může být důvodem recentního sbližování genomů obou druhů na tetraploidní úrovni. Naše výsledky tedy potvrzují dříve postulované tvrzení, že polyploidizace způsobila dodatečnou vnitrodruhovou reprodukční bariéru, zřejmě díky problematickému uchycení triploidů, kteří jsou nositeli genového toku mezi diploidní a tetraploidní ploidní úrovní (Stebbins, 1971), a mezi oběma ploidními úrovněmi nenacházíme jedince přechodného genotypu. I přesto je mezi skupinami stále předpokládán obousměrný genový tok (Jørgensen et al., 2011). Polyploidizace navíc způsobila efekt zvaný post-polyploidizační divergence, kdy právě přerušení genového toku mezi populacemi, způsobené polyploidizací, vede k divergenci obou linií (Kolář et al., 2017).

Autopolyploidizace *A. lyrata* je zároveň důvodem, proč může docházet k mezidruhovému genovému toku, protože překonává mezidruhovou reprodukční bariéru mezi *A. lyrata* a *A. arenosa* (Jørgensen et al., 2011), důvodem může být například pro mezidruhovou hybridizaci příhodnější strukturní změny chromosomů, které probíhají u polyploidů ((Ferguson & Sang, 2001), případně překonání bariér ve vývoji endospermu (Lafon-Placette et al., 2017). Proto jsou tetraploidi podle výstupů této práce více postiženi introgresí a díky tomu tvoří jasné skupiny v grafických výstupech nearest-neighbour network, kde zatím diploidní populace tvoří poměrně jednoznačně izolované a dobře navzájem se shlukující skupiny.

4. 3. Podoba hybridní zóny

Hybridní zóna má podobu trimodální hybridní zóny, která obsahuje plynulé přechody následujících typů genotypů: rodiče – introgresanti – intermediární hybridi, což bylo prokázáno pomocí analýzy RAD sekvenačních dat a což potvrdilo dříve naznačené závěry získané na menším datovém souboru na základě mikrosatelitových dat (Schmickl & Koch, 2011). Vzhledem k tomu, jak plynulý je gradient introgrese, všechny arbitrárně vytvořené skupiny do určité míry znemožňují dokonalé poznání dějů v oblasti. Pro další studie by

nejspíše bylo výhodnější pracovat alespoň s molekulárními daty jako s gradientem, tj. vytvořit z nich kovariátu, která by se používala ve všech dalších analýzách, místo rozdělení do skupin, které bylo použito v této práci.

Hybridní zónou prochází gradient nadmořské výšky. Právě tento gradient může být zásadní pro uchycení hybridů v místech s intermediární nadmořskou výškou (a tedy i jiným klimatem, než na okrajových částech regionu, kde se nachází rodičovské populace). Právě gradient nadmořské výšky je přítomný ve spoustě modelových systémů pro studium genového toku mezi populacemi a může odpovídat za jejich genetickou diverzifikaci (Hahn et al., 2012). Přehledová práce Abbota (Abbott, 2017) přináší detailní srovnání řady modelových systémů pro studium hybridizace, ve významném procentu z nich (asi jedna třetina zmiňovaných prací) je rozhodujícím abiotickým gradientem právě gradient nadmořské výšky.

4. 4. Ploidní úrovně

Analýza ploidních úrovní ukázala, že pouze jeden z rodičů se nachází v oblasti jako diploid. Při uvažování o tom, jaký je tedy původ tetraploidních hybridů v oblasti, můžeme tedy uvažovat různé hypotézy. Buď vznikl tetraploidní hybrid jako allopolyploid ze dvou diploidních druhů a až poté došlo k autopolyploidizačním událostem, případně došlo k náhradě původních rodičovských linií novými, které mohly být tetraploidní. Tomu nicméně nenahrává současné rozšíření *A. arenosa*, která se v oblasti vyskytuje jen jako tetraploid a pravděpodobnost, že by se zde kdysi vyskytoval jako diploid (a obě diploidní populace tak mohli existovat v sympatrii) je značně nízká. Zbývají tedy dvě možné hypotézy. První je následující: došlo ke dvěma nezávislým událostem - nezávisle vznikl hybrid heteroploidní hybridizací tetraploidní *A. arenosa* a diploidní *A. lyrata*, další nezávislou událostí byla autopolyploidizace *A. lyrata*, tím vznikla tetraploidní linie, která se poté rozšířila v oblasti a díky snažšímu genovému toku mezi hybridem a tetraploidem se poté obě tetraploidní linie sblížily a jsou drženy u sebe. Tuto situaci nicméně komplikuje problém s vývinem semene u potomků křížení diploidní *A. lyrata* a tetraploidní *A. arenosa* (Lafon-Placette et al., 2017), také této situace nenahrává současné rozšíření *A. lyrata*. Pravděpodobnější se tak jeví představa, že prvně došlo k autopolyploidizační události u *A. lyrata*, zřejmě v době po ústupu glaciálu, kdy tato náročná doba nahraovala díky nějaké blíže neurčené exogenně-selekční

výhodě tetraploidům, kteří se rapidně rozšířili i do oblastí s drsnějším klimatem, kde se jinak spíše teplomilnější diploidi nedostali. Při tomto postupu se potkali s alpskou linií *A. arenosa*, která buď také postupovala z nějakého hypotetického refugia umístěného více do hor, směrem na západ, anebo, vzhledem k větší odolnosti k horskému klimatu, mohla klidně glaciál přečkat na místech současného rozšíření.

Pro populaci AL73 (Faltbach), kde byly odebrány pouze dva jedinci, se nepodařilo stanovit ploidní úroveň pomocí průtokové cytometrie, vzhledem k vysoké nadmořské výšce a také vzhledem k tomu, že se jednalo o nejzápadnější část studovaného areálu, bylo předpokládáno, že se jedná o populaci *A. arenosa* a proto byly rostliny pro potřeby molekulárních analýz označeny za tetraploidy. Molekulární analýza potom ukázala, že se jedná o populaci *A. arenosa* s velmi nízkým stupněm introgrese, tetraploidní úroveň tedy byla populaci přiřazena správně.

4. 5. Gradient velikosti genomu

Monoploidní velikost genomu sleduje dva gradienty. Jednak gradient uvnitř druhu *A. lyrata*, kdy diploidi mají mnohem menší monoploidní relativní velikost genomu, než jejich tetraploidní příbuzní. Extrémně, co se velikost genomu týče, byla populace AL65 (St. Veiter Staff), která byl již výše komentována jako populace vymykající se z některých skupinových charakteristik. Do jisté míry můžeme předpokládat, že tetraploidi budou mít jinou monoploidní velikost genomu, než diploidi, což může souviset s bouří transposomálních elementů a dalšími genomovými přestavbami, která propuknou jako reakce na polyploidizaci (Šmarda & Bureš, 2010). V jiných systémech, ale tak výrazné rozdíly mezi monoploidní velikostí genomu diploidů a polyploidů nebyly pozorovány (např. Šlenker et al., 2018). To může být způsobeno tím, že genom takových rostlin je lépe uzpůsoben případné polyploidizaci a vůbec nedochází k tak masivnímu rozvoji dynamiky repetitivních sekvencí, případně může již být tato dynamika již utlumena nástupem nově vzniklých prostředků genomového silencingu, které inaktivují transponovatelné elementy, a nastupují tak mechanismy spíše snižující velikost genomu (takové jevy předpokládáme u dobře ustanovených a starých polyploidních linií).

Pokud budeme sledovat gradient velikosti genomu na celém území, tak hybridy mají intermediární velikost genomu. To je vzhledem k jejich allotetraploidní povaze nepřekvapivé, obsahují totiž ve svém genomu dvě sady chromozomů od *A. arenosa* a dvě sady od *A. lyrata* a tyto dva se liší velikostí genomu, kdy *A. lyrata* má značně větší velikost genomu než *A. arenosa* (Hohmann et al., 2014).

Zde se nabízí okomentovat svébytné postavení populace AL65, která kromě toho, že je významně izolovaná na základě molekulární analýzy (byla nejednoznačněji oddělenou skupinou podle analýzy PCA SNP dat (viz Obrázek 6a)), tak má i unikátní postavení, co se týče velikosti genomu, protože jako jediná populace *A. lyrata* spadá svou monoploidní velikostí genomu mezi hybridy. Důvodem je, že se jedná nepochybně o velmi reliktní populaci, dobře izolovanou i geograficky. Populace je navíc poměrně malá, co do počtu jedinců, můžeme tedy předpokládat, že zde došlo k nějakému efektu hrdla láhve, který umožnil prosazení změn vedoucích ke zmenšení velikosti genomu – např. nějakou výraznou delecí, či chromozomovou translokací, jejímž důsledkem je zmenšení genomu. Roli může hrát také sympatrický výskyt s druhem *A. halleri*, který mohl být také příčinou pozorované genetické divergence od ostatních skupin (*A. halleri* má nicméně větší velikost genomu než *A. lyrata* (Hohmann et al., 2014), tak si nemůžeme vliv případné introgrese na velikost genomu představovat jako čistě kvantitativní).

Pokud budeme sledovat velmi detailně sledovat situaci v regionu, odhalíme např. populace Totesweis a Hollental, tyto, podle našich kritérií určené jako *A. lyrata*, jsou hybridům nejbližší geograficky, velikostí genomu i morfologicky, důvodem všech těchto podobností je samozřejmě vysoký stupeň introgrese, kdy na základě podrobnějšího shlukování by tyto populace zřejmě byly označeny za skupinu hybridů podobných *A. lyrata*.

4. 6. Velikost genomu jako adaptivní znak

Názory, zda může být velikost genomu adaptivním znakem, či se jedná jen o stochastické změny v repetitivních sekvencích (které se ovšem hromadí a mohou vést k divergenci), se různí (resp. není dostatek informací o případné adaptivnosti), ale např. u kukuřice se již prokázalo, že velikost genomu může adaptivně reagovat na abiotické faktory a změny ve velikosti genomu mohou být způsobené například adaptací na nadmořskou výšku (Bilinski et al., 2018). Podobné trendy můžeme očekávat i ve studované

situaci, protože oblastí prochází významný gradient nadmořské výšky, který do jisté míry kopíruje gradient velikosti genomu (Obrázky 21a, 21b). Důvodem adaptivního významu, může být například jiná replikační dynamika (která přímo souvisí s velikostí replikovaného genomu) a s ní spojená rychlost vývoje buněk a obecně ovlivnění vývoje rostliny, co do načasování. To může souviset s vyšší invazivností rostlin, či jen rychlejším šířením, rostlin s větším genomem (viz „železniční tetraploid“ *A. arenosa*, který má zjevnou selekční výhodu oproti nativním diploidům a je schopen tolerovat větší rozsah abiotických faktorů, včetně obsazování ruderalních nik, kde se nativní populace nevyskytují (Baduel et al., 2016), podobně se hybridi *A. arenosa* a *A. lyrata* ukazují jako schopni kolonizace rozsáhlého území mezi výskyty rodičovských druhů, kde jednoznačně dominují (zřejmě díky nějaké ekologické výhodě, kterou ale může být rychlejší vývoj a nástup např. kvetení oproti druhu *A. arenosa* – toto je ovšem čirá spekulace a sběr fenologických dat nebyl předmětem této práce, byť se ukazuje jako potenciální další směr výzkumu spolu s podrobnější analýzou ekologických preferencí zastoupených skupin pomocí např. modelování ekologických nik).

Velikost genomu (resp. dynamika repetitivních sekvencí, která ji způsobuje) ale může být také dost dobře také selekčně neutrální (repetitivně sekvence byly koneckonců donedávna považovány za junk DNA, bez významnějšího vlivu na fenotyp), resp. její vliv na fenotyp a fitness rostliny může být taktéž velmi malý, ve srovnání s významem jiných adaptivních znaků. Za jejími změnami tak mohou stát selekčně nezávislé jevy tvořící genetický drift (efekt zakladatele, efekt hrdla láhve, apod.) (Šmarda & Bureš, 2010).

Právě to také může být důsledkem v této kapitole již diskutované extrémně malé velikosti genomu u populace AL65, zde způsobené změny ve velikosti genomu, jsou zřejmě způsobené nějakou výraznou delecí, populace se však nezdá být jakkoliv ovlivněná menším genomem, nebyla pozorována žádná ekologická odlišnost od ostatních populací a na její morfologii se odlišná velikost genomu výrazně neprojevuje – v PCA analýze se dokonce ukazuje jako podobnější tetraploidním populacím *A. lyrata*, než ostatním diploidům, se kterými sdílí podobnější monoploidní velikost genomu (viz Obrázky 6a a 10).

4. 7. Rozšíření rodičovských druhů

Současné rozšíření druhu *A. lyrata* ukazuje několik reliktních diploidních populací vázaných na oblast Wienervaldu s mírným klimatem a potom tetraploidní populace, které se pohybují na samém východním okraji Alp (ale stále v oblastech s mírným klimatem). Diploidi představují zřejmě izolované, reliktní populace (Muir et al., 2015), zatím co tetraploidi jsou dynamičtější, to může souviset i s rozdíly v monoploidní velikosti genomu, kdy introdukované či šířící se rostliny (evolučně mladší tetraploidi) mají větší velikost genomu než nativní populace (reliktní diploidi).

Druh *A. lyrata* je dnes limitovaný co do možného směru šíření, většina populací je obklopena lesy a nejsou tu žádné koridory pro případný genový tok. Diploidi jsou v tomto ohledu ještě izolovanější než tetraploidi. I proto dnes druh v oblasti představuje ustupující holocénní reliktní a na řadě dříve dokladovaných lokalit (např. z herbářového materiálu) je dnes již pravděpodobně vyhynulý. Důvodu ústupu je podléhání konkurenci úspěšnějších druhů a také ztráta preferovaných lokalit (což jsou skalky a skalní výchozy v oblastech bezlesí. V rámci sběrů materiálu pro tuto práci bylo navštíveno přibližně 10 takových populací, kde se druh dříve nacházel, ale dnes jsou lokality zarostlé lesem a rostliny se tu již nenachází. Takový trend ukázaly i provedené sběry v Česku a na Moravě (Jakub Hojka, nepublikovaný materiál).

Druh *A. arenosa* je vázaný na oblasti vyšší nadmořské výšky, i přesto se ale jedná o rostliny podobné spíše jeho nížinnému ekotypu, tedy poměrně rychle kolonizující, až plevelné, jednoleté rostliny, které dobře zvládají stres. Druh se rozhodně nedá (oproti druhému rodičovskému druhu) označit za reliktní, což naznačují i odhady počtu jedinců v jednotlivých navštívených populacích, kdy největší populace rodu *Arabidopsis* v oblasti představují právě populace druhu *A. arenosa*.

4. 8. Evoluční historie *A. arenosa* a *A. lyrata* v oblasti

Oba rodičovské druhy jsou velmi mladé, předpokládaný čas jejich divergence stanovený na základě analýzy plastomu je asi před 550 000 lety. Předpokládané centrum diverzity *A. arenosa* je v Karpatech, můžeme tedy usuzovat, že k oddělení druhů mohlo dojít v Pannonii, odkud se potom mladý druh *A. arenosa* vydal do Karpat, kde došlo k jeho výrazné diverzifikaci (zřejmě v souvislosti s proběhlou autopolyploidizační událostí) (Kolář

et al., 2016a). Tomu nasvědčuje i to, že ostatní příbuzné druhy *A. halleri* a i sesterský druh celé skupiny *A. thaliana* nejsou horské druhy. Centrum diverzity druhu *A. lyrata* by potom leželo ve střední Evropě, kde se dnes nachází už jen ojedinělé reliktní populace (je v tomto území tedy v jistém směru glaciálním reliktem) a hlavní oblast jeho výskytu dnes představují chladnější oblasti cirkumartické Eurasie (Ansell et al., 2010)

Po době ledové se druhy zřejmě nesetkávaly, což je obecně velmi častý jev porovávající speciaci u rodu *Arabidopsis*, která je tvořena dlouhými časovými obdobími, kdy se druhy nepotkávají a potom obdobími, kdy dochází k introgresi, která obecně činí studium fylogeneze u rodu *Arabidopsis* značně komplikované (Novikova et al., 2016)

K prvnímu takovému sekundárnímu kontaktu, který umožnil genový tok a vznik hybridů, došlo u studovaných přibližně před 300 000 lety, zřejmě v době předposledního interglaciálu (Hohmann & Koch, 2017). Od té doby ale k hybridizačním odálostem stále opakovaně dochází, produktem čehož je ostatně jemný gradient introgrese, z něhož usuzujeme na četná zpětná křížení mezi hybridy vyšších generací a rodičovskými druhy.

4. 9. Fenotypická plasticita u *A. arenosa*

Hlavní komplikací pro jakoukoliv morfologickou analýzu rostlin z čeledi Brassicaceae představuje značná fenotypická plasticita, za níž stojí v řadě případů gradient prostředí (Oyama, 1994), který v extrémních případech vede až ke vzniku různých ekotypů u rostlin v odlišných prostředích (například vysokohorské a nížinné), které se ale molekulárně vůbec neliší, náleží k těm samým genetickým liniím a jsou produktem paralelní evoluce (Kolář et al., 2016b, Konečná et al., nepublikovaný materiál), taková je situace například v druhu *Arabidopsis arenosa*, který je jedním ze druhů zastoupených v této práci. Jednotlivé ekotypy zřejmě u rostlin obecně mohou vznikat paralelně jako reakce na přechod do jiného habitatu, např. do vyšší nadmořské výšky (Dušková et al., 2017). Tato plasticita je sice poměrně zúžená ve studovaném systému, setkáváme se tu s jedinci *A. arenosa* poměrně uniformního ekotypu, i přesto ale byla u *A. arenosa* zcela nepřekvapivě prokázána značná morfologická plasticita, zejména ve srovnání s mnohem, co do morfologické variability, střídmejším druhým rodičovským druhem, *A. lyrata*. To potvrzují i výsledky klasifikační diskriminační analýzy – ze 187 jedinců *A. lyrata* bylo na základě morfologických znaků pouze cca jediné procento jedinců zařazeno chybně (tedy dva jedinci). Zato u *A. arenosa* byla

zhruba jedna pětina (9 jedinců ze 46) zařazena mezi hybridy. To je způsobeno zmíněnou značnou plasticitou *A. arenosa*, jehož někteří jedinci mají významný přesah právě s hybridními jedinci.

4. 10. Stabilita morfologických znaků rodičů

Rodiče se nicméně, co do variability morfologických znaků ukázaly být relativně stabilní, alespoň ve srovnání s hybridními populacemi. Při klasifikační diskriminační analýze byli jedinci rodičovských druhů řazeni zpět do správných skupin s mnohem větší pravděpodobností než u hybridů. Při kanonické diskriminační analýze byli tyto jedinci velmi přesvědčivě odděleni podle první kanonické osy.

Určovací znaky byly potvrzeny v dosavadní podobě (Slavík, 2002; Al-Shehbaz & O’Kane, 2002) a rozlišování rodičů by nemělo činit obtíže. Obecně platí, že *A. lyrata* má mnohem méně dělené listy, než *A. arenosa*, jednoznačně se to projevuje na podobě druhého stonkového listu, který je u *A. lyrata* nedělaný, zatímco u *A. arenosa* je dělený. Další významný rozdíl je v trichomech. U *A. lyrata* dominují na adaxiální straně rozetového listu jednoduché trichomy a obecně jsou rostliny méně chlupaté. *A. arenosa* je chlupatější a na adaxiální straně převažují trifurkátní trichomy.

4. 11. Morfologie hybridů

Hybridů se ukázali být méně homogenní, co do morfologických znaků než rodiče. Na ordinačním diagramu PCA tvořili souvislý pás mezi rodičovskými druhy. Byli zde zastoupeni jak hybridy s intermediárním fenotypem, tak jedinci bližší fenotypu některému z rodičů. Kanonická diskriminační analýza nedovedla přesvědčivě oddělit podle první osy samostatný shluk pro hybridní jedince, ale spíše vytvořila fenotypický gradient mezi rodiči. Při klasifikační analýze se ukázala jistá nesoudržnost hybridů, co do fenotypu, kdy bylo zhruba 32 % hybridů zařazeno do rodičovského druhu. 22 % bylo zařazeno do *A. lyrata* a zbylých asi 10 % bylo zařazeno do *A. arenosa*. To naznačuje, že kromě intermediárních jedinců, převažují mezi hybridy jedinci bližší k fenotypu *A. lyrata*.

Co se týče případných určovacích znaků pro determinaci hybridů, vzhledem k tomu, že v PCA analýze jsou rozděleni podle stejné osy jako rodiče a tvoří souvislý přechod mezi nimi, jsou i co do určovacích znaků intermediární a navíc, vzhledem k různým úrovním

introgrese, nevykazují jednoznačný hybridní fenotyp a nemůžeme tak ani vymezit jednoznačné určující znaky. Můžeme nicméně potvrdit, že v zásadních určujících znacích vykazují přechodné stavy mezi rodiči. Pokud u *A. lyrata* převažují na adaxiální straně růžicových listů jednoduché a vzácněji vidličnaté trichomy, u *A. arenosa* převažují trifurkátní trichomy a u hybridů většinou převažují vidličnaté a vzácně trifurkátní trichomy. Obecně jsou také chlupatější než *A. lyrata* (ale méně než *A. arenosa*).

4. 12. Životní strategie

V literatuře uváděná jednoletost *A. arenosa* a víceletost *A. lyrata* byla v této studii potvrzena měřením počtu kořenových větvení. Hybridi se v tomto znaku ukázali jako bližší *A. arenosa* a jsou většinou jednoletí či dvouletí, to může souviset s jejich agresivnějším stylem života, kdy mohou snadno a efektivně obsazovat volné ekologické niky v krajině. Obě tyto skupiny jsou také mnohem úspěšnější v kompetici oproti *A. lyrata*, který se v současnosti ve střední Evropě drží na reliktních bezlesích lokalitách a je dnes spíše na ústupu.

Analýza počtu stonků, úrovně větvení a stupně apikální dominance (zde bylo zaznamenáváno, zda existuje dominantní stonek, jasně dominující nad ostatními a zda jsou přítomny případné vedlejší stonky) prokázala, že u druhu *A. lyrata* se mnohem uplatňuje apikální dominance, což souvisí s tím, že rostliny *A. lyrata* jsou obecně kompaktnější a drobnější. I díky tomu jsou tak kompetičně slabé oproti mnohem více se větvíci a rozrůstající se *A. arenosa* a hybridům, kde apikální dominance není tak významná.

4. 13. Reflexe morfometrických znaků na gradientu nadmořské výšky a velikosti genomu

Součástí této analýzy nebyl opravdový test závislosti mezi molekulárními znaky, morfologickými znaky a velikostí genomu. Byla nicméně provedena alespoň pasivní projekce gradientu nadmořské výšky, velikosti genomu a také koordinát první osy PCA z analýzy SNP dat na ordinační diagram PCA z matice morfologických dat. Ve všech případech se vrstevnice promítaných gradientů zobrazili jako kolmé na první osu PCA morfologických znaků, což naznačuje, že morfologie je v těchto gradientech významně reflektována.

4. 14. Systematický pohled na situaci v regionu

Na základě analýzy DAPC byly odděleny čisté rodičovské linie. Tyto linie se ukázaly být morfologicky stabilní, mají odlišnou velikost genomu a existují pro ně použitelné určovací znaky.

Hybridi se ukázali být ve zmíněných ukazatelích intermediární, byť jejich odlišení od rodičů na základě morfologie je obtížné. Ani na základě molekulárních dat nevytváří jednoznačně oddělenou skupinu a proto by bylo velmi předčasné je vymezovat coby samostatný druh. Oproti ostatním allopolyploidním druhům (*A. suecica* (Jakobsson et al., 2006), *A. kamchatica* (Shimizu-Inatsugi et al., 2009)) se zde setkáváme s mnohem živějším a dynamičtějším systémem, který je navíc stále živý a stále dochází ke zpětným křížením (to se o ostatních systémech nedá říct, u nich již neexistuje sekundární kontaktní zóna, kterou v Rakousku stále nacházíme), i proto by ustanovení hybridů coby samostatného taxonu bylo velmi předčasné.

4. 15. Důvod úspěchu hybridů

Z potenciálně adaptivních morfologických znaků, v němž by hybridy vynikali oproti rodičům, stojí za to zmínit již výše zmíněnou výhodu v životním cyklu a úrovni větvení, kdy hybridní rostliny jsou jednoleté a díky většímu vzrůstu a větvení (oproti *A. lyrata*) jsou kompetičně silnější.

Území, kde se hybridy nalézají, z obou stran ohraničené rozšířeními rodičovských druhů, představuje hypotetickou intermediární niku, co do abiotických gradientů procházejících územím (např. co do nadmořské výšky, viz graf pasivní projekce nadmořské výšky na ordinační diagram PCA morfologických znaků, Obrázek 21b). Jedná se o území mezi horským, téměř až alpským, klimatem (kde se nachází *A. arenosa*) a mírným panonským klimatem (kde se nachází nížinná *A. lyrata*).

Dále byla pozorována tendence hybridů k synantropnějším habitatům (nabízí se podobnost s „železničním genotypem“ *A. arenosa* (Baduel et al., 2016) a dalšími modelovými systémy (Lihová et al., 2007)), můžeme snad i podobně usuzovat, že jsou hybridy odolnější k některým stresovým faktorům, v lokalitě jejich výskytu to může

představovat například lepší tolerance sucha. Hybridi se díky tomu často vyskytují na suti, což je substrát, na kterém rodičovské druhy nenacházíme.

Důvod zdánlivého výskytu hybridů na synantropních habitatech ale může být mnohem prozaičtější – hybridy jsou totiž (podobně jako rodičovské druhy) vázáni na bezlesí a silnice a cesty potom představují velmi výhodné koridory pro jejich šíření. V současné situaci, kdy v oblasti spíše přibývá lesů a místa primárního bezlesí zarůstají vegetací, jsou totiž rostliny odkázány buď na ostrůvky primárního bezlesí jako u druhu *A. lyrata* a nebo se mohou šířit oblastmi sekundárního bezlesí způsobeného lidskou činností (odkryvy skal v zářezech silnic, apod.). Při takové „kolonizaci“ samozřejmě hybridům vyhovuje zmíněná tolerance sucha a rychlejší životní cyklus (jednoletost až dvouletost oproti víceletému *A. lyrata*).

5. Závěr

Práce si kladla za cíl posoudit genetickou, morfologickou a cytotypovou variabilitu druhů *Arabidopsis lyrata*, *A. arenosa* a jejich potenciálních hybridů v oblasti Předhůří Alp. Otázky kladené v úvodu práce byly zodpovězeny a práce přináší doposud nejdetailnější vhled do situace, jak do počtu studovaných populací, tak do záběru použitých metod. Poprvé byla v oblasti použita plnohodnotná morfometrická analýza a analýza velikosti genomu.

Analýza molekulárních dat odhalila gradient introgrese, který velmi zvolna přechází od jednoho rodičovského druhu k druhému a zahrnuje celou škálu hybridních genotypů, od intermediárních, až po velmi podobné rodičovským druhům. Genetická variabilita je dobře reflektována geograficky, rozmístění populací ale kromě geografického trendu sleduje také gradient nadmořské výšky. Hybridní zóna má podobu tzv. trimodální hybridní zóny, tedy v ní neprobíhá ani selekce proti hybridům, ani nejsou hybridi výrazně zvýhodněni oproti rodičům, existuje tu gradient introgrese, jsou zde zastoupeny všechny genotypy a jejich kombinace. Výjimku tvoří diploidi *A. lyrata*, kteří představují reliktní skupinu, jsou geneticky velmi dobře vymezení, geograficky izolovaní a jsou nejméně postiženi introgresí. Oproti tomu hybridi se zdají být kompetičně úspěšní, možná díky vazbě na synantropní habitaty a přechodu na jednoletý způsob života.

Oblastí prochází také gradient velikosti genomu tetraploidů, hybridi mají intermediární velikost genomu. Diploidi *A. lyrata* mají menší velikost genomu, zřejmě díky efektu hrdla láhve, který se může naplno projevit právě v malých izolovaných populacích. Větší monoploidní velikost genomu tetraploidů *A. lyrata* ale může být vysvětlena také oscilacemi provázející polyploidizační události (např. ve formě změny dynamiky repetitivních sekvencí).

Genetická variabilita je reflektována morfologickou variabilitou, někteří hybridní jedinci jsou intermediární co do genotypu i fenotypu, jiní jsou bližší některému z rodičů a neexistuje ostrý přechod mezi hybridy a rodičovskými druhy, i proto je problém hybridy rozeznat morfologicky a určit jasné determinační znaky. Oproti tomu rodičovské druhy jsou morfologicky stabilní, determinační znaky byly potvrzeny v doposud používané podobě.

Ve své příští práci bych rád rozšířil studii také o oblast Wachau, kde se také nachází potenciální hybridní populace. Zcela jiný směr potom představuje zamýšlené studium fylogeografie druhu *A. lyrata*, neboť z materiálu, který nakonec v této práci nebyl použit, víme, že v celé střední Evropě se setkáváme s oběmi ploidními úrovněmi a otázka evoluční historie obou cytotypů zatím nebyla uspokojivě zodpovězena (není ani bezpečně známo, zda jsou všichni tetraploidi produktem jediné polyploidizační události). Ve střední Evropě se také nachází další místa sekundárního styku rodičovských druhů a tak i další potenciální hybridní zóny.

Pro lepší podchycení vlivu abiotických gradientů bych chtěl do příští práce zapojit také modelování ekologických nik, které by umožnilo modelovat evoluční historii druhů jak v oblasti, která je předmětem této práce, tak i v celé střední Evropě.

6. Seznam použité literatury

- Abbott, R.J. (2017). Plant speciation across environmental gradients and the occurrence and nature of hybrid zones. *J. Syst. Evol.* 55, 238–258.
- Adams, K.L. (2007). Evolution of Duplicate Gene Expression in Polyploid and Hybrid Plants. *J. Hered.* 98, 136–141.
- Akiyama, Y., Kimura, K., Kubota, A., Fujimori, M., Yamada-Akiyama, H., Takahara, Y., and Ueyama, Y. (2015). Comparison of Genome Size in Reed Canarygrass (*Phalaris arundinacea* L.) Exotic and Putative Native Japanese Genotypes by Flow Cytometry. *Jarq-Jpn. Agric. Res. Q.* 49, 345–350.
- Al-Shehbaz, I.A., and O’Kane, S.L. (2002). Taxonomy and Phylogeny of *Arabidopsis* (Brassicaceae). *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* 1.
- Anderson, E. (1953). Introgressive Hybridization. *Biol. Rev.* 28, 280–307.
- Ansell, S.W., Stenøien, H.K., Grundmann, M., Schneider, H., Hemp, A., Bauer, N., Russell, S.J., and Vogel, J.C. (2010). Population structure and historical biogeography of European *Arabidopsis lyrata*. *Heredity* 105, 543–553.
- Ardila-Garcia, A.M., Umphrey, G.J., and Gregory, T.R. (2010). An expansion of the genome size dataset for the insect order Hymenoptera, with a first test of parasitism and eusociality as possible constraints. *Insect Mol. Biol.* 19, 337–346.
- Arnold, M.L. (1992). Natural Hybridization as an Evolutionary Process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 23, 237–261.
- Baack, E.J., Whitney, K.D., and Rieseberg, L.H. (2005). Hybridization and genome size evolution: timing and magnitude of nuclear DNA content increases in *Helianthus* homoploid hybrid species. *New Phytol.* 167, 623–630.
- Baduel, P., Arnold, B., Weisman, C.M., Hunter, B., and Bomblies, K. (2016). Habitat-Associated Life History and Stress-Tolerance Variation in *Arabidopsis arenosa*. *Plant Physiol.* 171, 437–451.
- Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., Selker, E.U., Cresko, W.A., and Johnson, E.A. (2008). Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLOS ONE* 3, e3376.
- Barringer, B.C. (2007). Polyploidy and self-fertilization in flowering plants. *Am. J. Bot.* 94, 1527–1533.
- Barton, N.H., and Hewitt, G.M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 16, 113–148.
- Bennetzen, J.L., and Wang, H. (2014). The contributions of transposable elements to the structure, function, and evolution of plant genomes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 65, 505–530.

- Bilinski, P., Albert, P.S., Berg, J.J., Birchler, J.A., Grote, M.N., Lorant, A., Quezada, J., Swarts, K., Yang, J., and Ross-Ibarra, J. (2018). Parallel altitudinal clines reveal trends in adaptive evolution of genome size in *Zea mays*. *PLOS Genet.* *14*, e1007162.
- Braak, C.J.F. ter, and Smilauer, P. (2012). Canoco reference manual and user's guide: software for ordination, version 5.0 (Ithaca USA: Microcomputer Power).
- Braun-Blanquet, J. (1964). *Pflanzensoziologie; Grundzüge der Vegetationskunde*, (Wien; New York: Springer-Verlag).
- Clausen, R.E. (1941). Polyploidy in *Nicotiana*. *Am. Nat.* *75*, 291–306.
- Clauss, M.J., and Mitchell-Olds, T. (2006). Population genetic structure of *Arabidopsis lyrata* in Europe. *Mol. Ecol.* *15*, 2753–2766.
- Comai, L. (2005). The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 836–846.
- Coyne, J.A., and Orr, H.A. (2004). *Speciation* (Oxford, New York: Oxford University Press).
- Dodsworth, S., Leitch, A.R., and Leitch, I.J. (2015). Genome size diversity in angiosperms and its influence on gene space. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *35*, 73–78.
- Doležel, J., Greilhuber, J., and Suda, J. (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* *2*, 2233–2244.
- Douglas, G.M., Gos, G., Steige, K.A., Salcedo, A., Holm, K., Josephs, E.B., Arunkumar, R., Ågren, J.A., Hazzouri, K.M., Wang, W., et al. (2015). Hybrid origins and the earliest stages of diploidization in the highly successful recent polyploid *Capsella bursa-pastoris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 2806–2811.
- Dušková, E., Sklenář, P., Kolář, F., Vásquez, D.L.A., Romoleroux, K., Fér, T., and Marhold, K. (2017). Growth form evolution and hybridization in *Senecio* (Asteraceae) from the high equatorial Andes. *Ecol. Evol.* *7*, 6455–6468.
- Ferguson, D., and Sang, T. (2001). Speciation through homoploid hybridization between allotetraploids in peonies (*Paeonia*). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 3915–3919.
- Flegr, J. (2009). *Evoluční biologie* (Academia).
- Fuji, S., Kudoh, H., Shimizu, K. K., and Watanabe, K., Marhold, K. (*Arabidopsis kamchatica* (Fisch. ex DC.) K. Shimizu & Kudoh and *A. kamchatica* subsp. *kawasakiana* (Makino) K. Shimizu & Kudoh, New Combinations. *Acta Phytotaxon. Geobot.* *2005*, 163–172.
- Gay, L., Crochet, P.-A., Bell, D.A., and Lenormand, T. (2008). Comparing clines on molecular and phenotypic traits in hybrid zones: a window on tension zone models. *Evol. Int. J. Org. Evol.* *62*, 2789–2806.
- Goodman, S.J., Barton, N.H., Swanson, G., Abernethy, K., and Pemberton, J.M. (1999). Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics* *152*, 355–371.

- Gow, J.L., Peichel, C.L., and Taylor, E.B. (2007). Ecological selection against hybrids in natural populations of sympatric threespine sticklebacks. *J. Evol. Biol.* *20*, 2173–2180.
- Hahn, T., Kettle, C.J., Ghazoul, J., Frei, E.R., Matter, P., and Pluess, A.R. (2012). Patterns of Genetic Variation across Altitude in Three Plant Species of Semi-Dry Grasslands. *PLoS ONE* *7*, 7(8), e41608.
- Harrison, R., and M. Bogdanowicz, S. (1997). Patterns of Variation and Linkage Disequilibrium in a Field Cricket Hybrid Zone. *Evolution* *51*, 493.
- Hatfield, T., and Schluter, D. (1999). Ecological Speciation in Sticklebacks: Environment-Dependent Hybrid Fitness. *Evolution* *53*, 866–873.
- Hohmann, N., and Koch, M.A. (2017). An Arabidopsis introgression zone studied at high spatio-temporal resolution: interglacial and multiple genetic contact exemplified using whole nuclear and plastid genomes. *BMC Genomics* *18*, 810.
- Hohmann, N., Schmickl, R., Chiang, T.-Y., Lučanová, M., Kolář, F., Marhold, K., and Koch, M.A. (2014). Taming the wild: resolving the gene pools of non-model Arabidopsis lineages. *BMC Evol. Biol.* *14*, 224.
- Hollister, J.D. (2015). Polyploidy: adaptation to the genomic environment. *New Phytol.* *205*, 1034–1039.
- Hu, T.T., Pattyn, P., Bakker, E.G., Cao, J., Cheng, J.-F., Clark, R.M., Fahlgren, N., Fawcett, J.A., Grimwood, J., Gundlach, H., et al. (2011). The Arabidopsis lyrata genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nat. Genet.* *43*, 476–481.
- Husband, B.C., and Sabara, H.A. (2004). Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytol.* *161*, 703–713.
- Huson, D.H., and Bryant, D. (2006). Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 254–267.
- Ibarra-Laclette, E., Lyons, E., Hernández-Guzmán, G., Pérez-Torres, C.A., Carretero-Paulet, L., Chang, T.-H., Lan, T., Welch, A.J., Juárez, M.J.A., Simpson, J., et al. (2013). Architecture and evolution of a minute plant genome. *Nature* *498*, 94–98.
- Ito, H., Langenhorst, T., Ogden, R., and Inoue-Murayama, M. (2015). Population genetic diversity and hybrid detection in captive zebras. *Sci. Rep.* *5*, 13171.
- Jakobsson, M., Hagenblad, J., Tavaré, S., Säll, T., Halldén, C., Lind-Halldén, C., and Nordborg, M. (2006). A unique recent origin of the allotetraploid species *Arabidopsis suecica*: Evidence from nuclear DNA markers. *Mol. Biol. Evol.* *23*, 1217–1231.
- Jedrzejczyk, I., and Rewers, M. (2018). Genome size and ISSR markers for *Mentha* L. (Lamiaceae) genetic diversity assessment and species identification. *Ind. Crops Prod.* *120*, 171–179.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *24*, 1403–1405.

- Jørgensen, M.H., Ehrich, D., Schmickl, R., Koch, M.A., and Brysting, A.K. (2011). Interspecific and interploidal gene flow in Central European *Arabidopsis* (Brassicaceae). *BMC Evol. Biol.* *11*, 346.
- Kiefer, M., Schmickl, R., German, D.A., Mandáková, T., Lysak, M.A., Al-Shehbaz, I.A., Franzke, A., Mummenhoff, K., Stamatakis, A., and Koch, M.A. (2014). BrassiBase: introduction to a novel knowledge database on Brassicaceae evolution. *Plant Cell Physiol.* *55*, e3.
- Koch, M.A., Wernisch, M., and Schmickl, R. (2008). *Arabidopsis thaliana*'s wild relatives: an updated overview on systematics, taxonomy and evolution. *Taxon* *57*, 933–943.
- Köhler, C., Mittelsten Scheid, O., and Erilova, A. (2010). The impact of the triploid block on the origin and evolution of polyploid plants. *Trends Genet. TIG* *26*, 142–148.
- Kolář, F., Lučanová, M., Závěská, E., Fuxová, G., Mandáková, T., Španiel, S., Senko, D., Svitok, M., Kolník, M., Gudžinskas, Z., et al. (2016a). Ecological segregation does not drive the intricate parapatric distribution of diploid and tetraploid cytotypes of the *Arabidopsis arenosa* group (Brassicaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* *119*, 673–688.
- Kolář, F., Fuxová, G., Závěská, E., Nagano, A.J., Hyklová, L., Lučanová, M., Kudoh, H., and Marhold, K. (2016b). Northern glacial refugia and altitudinal niche divergence shape genome-wide differentiation in the emerging plant model *Arabidopsis arenosa*. *Mol. Ecol.* *25*, 3929–3949.
- Kolář, F., Čertner, M., Suda, J., Schönschwetter, P., and Husband, B.C. (2017). Mixed-Ploidy Species: Progress and Opportunities in Polyploid Research. *Trends Plant Sci.* *22*, 1041–1055.
- Koutecký, P. (2015). MorphoTools: a set of R functions for morphometric analysis. *Plant Syst. Evol.* *301*, 1115–1121.
- Kron, P., Suda, J., and Husband, B.C. (2007a). Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* *38*, 847–876.
- Lafon-Placette, C., Johannessen, I.M., Hornslien, K.S., Ali, M.F., Bjerkan, K.N., Bramsiepe, J., Glöckle, B.M., Rebernig, C.A., Brysting, A.K., Grini, P.E., et al. (2017). Endosperm-based hybridization barriers explain the pattern of gene flow between *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis arenosa* in Central Europe. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *114*, E1027–E1035.
- Lavergne, S., Muenke, N.J., and Molofsky, J. (2010). Genome size reduction can trigger rapid phenotypic evolution in invasive plants. *Ann. Bot.* *105*, 109–116.
- Leitch, I.J., Hanson, L., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Clarkson, J.J., and Leitch, A.R. (2008). The Ups and Downs of Genome Size Evolution in Polyploid Species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann. Bot.* *101*, 805–814.
- Lihová, J., Kučera, J., Perný, M., and Marhold, K. (2007). Hybridization between Two Polyploid Cardamine (Brassicaceae) Species in North-western Spain: Discordance Between Morphological and Genetic Variation Patterns. *Ann. Bot.* *99*, 1083–1096.
- Lisch, D. (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nat. Rev. Genet.* *14*, 49–61.
- Lövkvist, B. (1956). The Cardamine pratensis complex. Outline of its cytogenetics and taxonomy. *Symb. Bot. Ups.* *1956*, 1–131.

- Lysak, M.A., Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., and Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5224–5229.
- Macková, L., Vít, P., and Urfus, T. (2018). Crop-to-wild hybridization in cherries-Empirical evidence from *Prunus fruticosa*. *Evol. Appl.*
- Mandáková, T., and Lysak, M.A. (2018). Post-polyploid diploidization and diversification through dysploid changes. *Curr. Opin. Plant Biol.* *42*, 55–65.
- Mandáková, T., Joly, S., Krzywinski, M., Mummenhoff, K., and Lysak, M.A. (2010). Fast Diploidization in Close Mesopolyploid Relatives of *Arabidopsis*. *Plant Cell* *22*, 2277–2290.
- Marhold, K. (2011). Chapter 6. Multivariate morphometrics and its application to monography at specific and infraspecific levels. In *Monographic Plant Systematics: Fundamental Assessment of Plant Biodiversity*, (Ruggell: A. R. G. Gantner Verlag K. G), pp. 73–99.
- Marhold, K., Kudoh, H., Pak, J.-H., Watanabe, K., Španiel, S., and Lihová, J. (2010a). Cytotype diversity and genome size variation in eastern Asian polyploid Cardamine (Brassicaceae) species. *Ann. Bot.* *105*, 249–264.
- Marks, G.E. (1966). The Origin and Significance of Intraspecific Polyploidy: Experimental Evidence from *Solanum Chacoense*. *Evolution* *20*, 552–557.
- Marques, I., Loureiro, J., Draper, D., Castro, M., and Castro, S. (2018). How much do we know about the frequency of hybridisation and polyploidy in the Mediterranean region? *Plant Biol. Stuttg. Ger.* *20 Suppl 1*, 21–37.
- Martinez, M.A., Baack, E.J., Hovick, S.M., and Whitney, K.D. (2018). A reassessment of the genome size-invasiveness relationship in reed canarygrass (*Phalaris arundinacea*). *Ann. Bot.* *121*, 1309–1318.
- Matzke, M.A., and Mosher, R.A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* *15*, 394–408.
- Mayr, E. (1996). What is a Species, and What is Not? *Philos. Sci.* *63*, 262–277.
- Muir, G., Ruiz-Duarte, P., Hohmann, N., Mable, B.K., Novikova, P., Schmickl, R., Guggisberg, A., and Koch, M.A. (2015). Exogenous selection rather than cytonuclear incompatibilities shapes asymmetrical fitness of reciprocal *Arabidopsis* hybrids. *Ecol. Evol.* *5*, 1734–1745.
- Novikova, P.Y., Hohmann, N., Nizhynska, V., Tsuchimatsu, T., Ali, J., Muir, G., Guggisberg, A., Paape, T., Schmid, K., Fedorenko, O.M., et al. (2016). Sequencing of the genus *Arabidopsis* identifies a complex history of nonbifurcating speciation and abundant trans-specific polymorphism. *Nat. Genet.* *48*, 1077–1082.
- Novikova, P.Y., Tsuchimatsu, T., Simon, S., Nizhynska, V., Voronin, V., Burns, R., Fedorenko, O.M., Holm, S., Säll, T., Prat, E., et al. (2017). Genome Sequencing Reveals the Origin of the Allotetraploid *Arabidopsis suecica*. *Mol. Biol. Evol.* *34*, 957–968.
- Oney-Birol, S., and Tabur, S. (2018). Genome Size and Morphological Variations in *Brachypodium Distachyon* L. Along Altitudinal Levels. *Pak. J. Bot.* *50*, 1923–1933.

- Oyama, K. (1994). Differentiation in phenotypic plasticity among populations of *Arabis serrata* Fr. & Sav. (Brassicaceae). *Biol. J. Linn. Soc.* *51*, 417–432.
- Parks, D.H., Tyson, G.W., Hugenholtz, P., and Beiko, R.G. (2014). STAMP: statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics* *30*, 3123–3124.
- Pellicer, J., Fay, M.F., and Leitch, I.J. (2010). The largest eukaryotic genome of them all? *Bot. J. Linn. Soc.* *164*, 10–15.
- Peterson, B.K., Weber, J.N., Kay, E.H., Fisher, H.S., and Hoekstra, H.E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PloS One* *7*, e37135.
- Polatschek, A. (1966). Cytotaxonomische Beiträge zur Flora der Ostalpenländer. *Österr. Bot. Z.* 1–46.
- Rejmánek, M. (1996). A theory of seed plant invasiveness: The first sketch. *Biol. Conserv.* *78*, 171–181.
- Renfrew, C., and Barbujani, G. (1994). Genetic variation in North Africa and Eurasia: Neolithic demic diffusion vs. paleolithic colonisation. *Am. J. Phys. Anthropol.* *95*(2), 137–154.
- Rieseberg, L., and Wendel, J. (1993). Introgression and Its Consequences in Plants. *Hybrid Zones Evol. Process* 70–109.
- Saitou, N., and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* *4*, 406–425.
- Sarma, V. (2018). More than a handful of dirt: sequence-based species description and the role of the ICN (a response to Seifert). *IMA Fungus* *9*, 36–39.
- Schatlowski, N., and Köhler, C. (2012). Tearing down barriers: understanding the molecular mechanisms of interploidy hybridizations. *J. Exp. Bot.* *63*, 6059–6067.
- Schmickl, R., and Koch, M.A. (2011). Arabidopsis hybrid speciation processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 14192–14197.
- Scott, R.J., Spielman, M., Bailey, J., and Dickinson, H.G. (1998). Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 3329–3341.
- Shimizu-Inatsugi, R., Lihová, J., Iwanaga, H., Kudoh, H., Marhold, K., Savolainen, O., Watanabe, K., Yakubov, V.V., and Shimizu, K.K. (2009). The allopolyploid *Arabidopsis kamchatica* originated from multiple individuals of *Arabidopsis lyrata* and *Arabidopsis halleri*. *Mol. Ecol.* *18*, 4024–4048.
- Slatkin, M. (1973). Gene Flow and Selection in a Cline. *Genetics* *75*, 733–756.
- Slavík, B. (2002). *Cardaminopsis*. In *Klíč k určování cévnatých rostlin České republiky*, (Academia).
- Šlenker, M., Zozomová-Lihová, J., Mandáková, T., Kudoh, H., Zhao, Y., Soejima, A., Yahara, T., Skokanová, K., Španiel, S., and Marhold, K. (2018). Morphology and genome size of the widespread weed *Cardamine occulta*: how it differs from cleistogamic *C. kokaiensis* and other closely related taxa in Europe and Asia. *Bot. J. Linn. Soc.* *187*, 456–482.

- Šmarda, P., and Bureš, P. (2010). Understanding intraspecific variation in genome size in plants. *Preslia* 82, 41–61.
- Soltis, P., and Soltis, D.E. (2012). *Polyploidy and Genome Evolution* (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).
- Španiel, S., Marhold, K., and Zozomová-Lihová, J. (2017a). The polyploid *Alyssum montanum*-*A. repens* complex in the Balkans: a hotspot of species and genetic diversity. *Plant Syst. Evol.* 303, 1443–1465.
- Španiel, S., Zozomová-Lihová, J., and Marhold, K. (2017b). Revised taxonomic treatment of the *Alyssum montanum*-*A. repens* complex in the Balkans: a multivariate morphometric analysis. *Plant Syst. Evol.* 303, 1413–1442.
- Španiel, S., Haburajova, L., and Cetlova, V. (2018). Diploid and tetraploid cytotypes and subspecies of *Odontarrhena tortuosa* (Brassicaceae) in Pannonia: differences in morphology, ecology and genome size. *Phytotaxa* 358, 162–180.
- Stebbins, G.L. (1971). *Chromosomal evolution in higher plants*. (Edward Arnold LTD, London).
- Štorchová, H., Hrdličková, R., Chrtěk, J., Tetera, M., Fitze, D., and Fehrer, J. (2000). An Improved Method of DNA Isolation from Plants Collected in the Field and Conserved in Saturated NaCl/CTAB Solution. *Taxon* 49, 79–84.
- Suarez-Gonzalez, A., Hefer, C.A., Christe, C., Corea, O., Lexer, C., Cronk, Q.C.B., and Douglas, C.J. (2016). Genomic and functional approaches reveal a case of adaptive introgression from *Populus balsamifera* (balsam poplar) in *P. trichocarpa* (black cottonwood). *Mol. Ecol.* 25, 2427–2442.
- Taylor, S.A., Larson, E.L., and Harrison, R.G. (2015). Hybrid zones: windows on climate change. *Trends Ecol. Evol.* 30, 398–406.
- Temsch, E.M., Greilhuber, J., and Krisai, R. (2010). Genome size in liverworts. *Preslia* 82, 63–80.
- Thomas, C.A. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* 5, 237–256.
- Van Der Maarel, E., and Westhoff, V. (1973). The Braun-Blanquet Approach. In *Ordination and Classification of Communities*, (Junk, The Hague, NL.), pp. 617–726.
- Veselý, P., Bureš, P., Šmarda, P., and Pavlíček, T. (2012). Genome size and DNA base composition of geophytes: the mirror of phenology and ecology? *Ann. Bot.* 109, 65–75.
- Wolf, D.E., Takebayashi, N., and Rieseberg, L.H. (2001). Predicting the Risk of Extinction through Hybridization. *Conserv. Biol.* 15, 1039–1053.
- Zalapa, J.E., Brunet, J., and Guries, R.P. (2010). The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae). *Evol. Appl.* 3, 157–168.

7. Přílohy

Příloha 1. Výsledky shlukovací analýzy

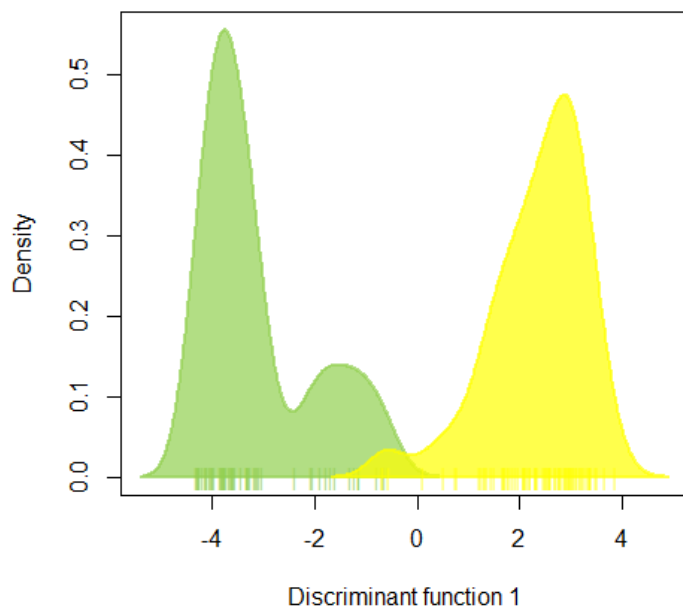
Tabulka 1. Vlevo kompletní datový soubor, vpravo analýza pouze pro tetraploidní jedince. Každá barva označuje jeden ze shluků vytvořených při analýze.

Jedinec	Kompletní datový soubor		Pouze tetraploidi			
	K=2	K=3	K=2	K=3	K=4	K=5
AL08_Y2	AL	AL				
AL08_Y3	diploid	AL				
AL08_Y7	diploid	AL				
AL26_29	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL26_30	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL26_33	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL26_X3	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL26_X7	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL27_20	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL27_22	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL27_23	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL27_24	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL27_28	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL28_16	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL28_24	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL28_26	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL29_17	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL29_18	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL29_19	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid
AL29_22	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL29_23	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL29_24	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL30_20	diploid	AL				
AL30_25	diploid	AL				
AL30_28	diploid	AL				
AL30_X1	diploid	AL				
AL30_X2	diploid	AL				
AL30_X3	diploid	AL				
AL31_16	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL31_18	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL32_16	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL32_17	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL32_20	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL32_23	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL32_25	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL32_26	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL33_14	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL33_15	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL33_16	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL33_17	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL33_18	AL	AL	AL	AL	AL	AL

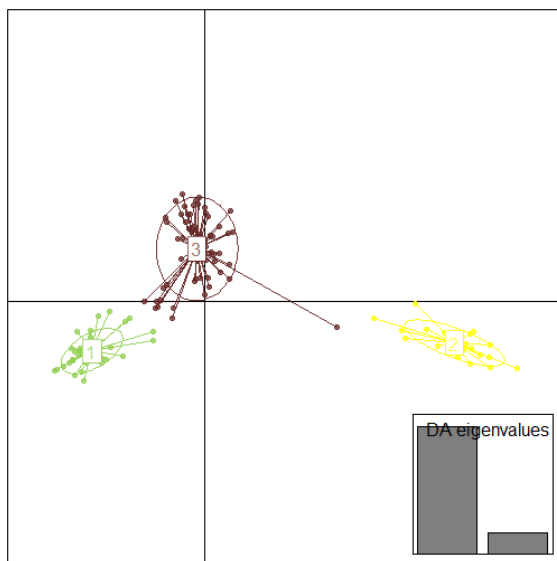
AL33_19	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL33_20	AL	AL	AL	AL	AL	AL
AL34_16	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL34_18	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL34_22	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL34_23	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL34_24	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL34_25	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL35_18	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL35_19	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL35_20	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	lyrata-like
AL35_24	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL35_25	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL37_16	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL37_17	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL37_19	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL37_22	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL37_24	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_22	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_23	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_25	AL	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_X1	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_X2	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL38_X4	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL39_11	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL39_12	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL39_14	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL39_16	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	hybrid
AL39_18	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL39_24	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL40_14	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL40_15	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL40_17	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL40_19	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL40_20	AA	AA	AA	AA	AA	arenosa-like
AL41_14	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL41_16	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL41_17	AA	AA	AA	AA	AA	arenosa-like
AL41_18	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	arenosa-like
AL41_19	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL42_13	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL42_14	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL42_15	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL43_14	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL43_17	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL43_18	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL43_20	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL44_14	AL	AA	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid
AL44_17	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid
AL44_18	AL	AL	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid
AL44_19	AL	AA	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid

AL64_16	diploid	AL				
AL64_18	diploid	AL				
AL64_19	diploid	AL				
AL64_20	diploid	AL				
AL64_21	diploid	AL				
AL64_22	diploid	AL				
AL64_23	diploid	AL				
AL64_25	diploid	AL				
AL65_12	diploid	AL				
AL65_13	diploid	AL				
AL65_14	diploid	AL				
AL65_15	diploid	AL				
AL65_16	diploid	AL				
AL65_17	diploid	AL				
AL70_16	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL70_17	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL70_18	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL70_19	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL70_20	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	hybrid
AL70_22	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	hybrid
AL70_23	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL70_25	AA	AA	AA	AA	arenosa-like	arenosa-like
AL72_16	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL72_17	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL72_19	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL72_20	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL72_22	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL72_23	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	arenosa-like
AL72_24	AL	AA	AL	hybrid	lyrata-like	hybrid
AL72_25	AA	AA	AA	hybrid	arenosa-like	arenosa-like
AL72_26	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL73_01	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL73_02	AA	AA	AA	AA	AA	AA
AL74_13	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL74_14	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like
AL74_15	AL	AL	AL	AL	lyrata-like	lyrata-like

Příloha 2. Výsledky analýzy DAPC pro kompletní datový soubor



Obrázek 1a. Analýza DAPC kompletního datového souboru pro K=2



Obrázek 1b. Analýza DAPC kompletního datového souboru pro K=3.

Příloha 3a. Seznam populací zařazených do této práce

Tabulka 1. Tučně jsou vyznačené diploidní populace. Populace byly do skupin rozděleny na základě převažující příslušnosti jedinců do skupin při analýze DAPC (viz příloha 1).

ID	Skupina	Lokalita	Souřadnice		Nadm. výška	Ploidie	Odhad počtu jedinců
AL08	<i>A. lyrata</i>	Vöslauer Hütte	47°58'47.15"	16°09'49.64"	485 m.n.n.	2n	ca. 200
AL26	<i>A. lyrata</i>	Liechtenstein Castle	48°05'34.20"	16°16'14.61"	298 m.n.n.	4n	ca. 200
AL27	<i>A. lyrata</i>	Castle Ruin Mödling	48°04'46.38"	16°16'01.84"	335 m.n.n.	4n	ca. 100
AL28	<i>A. lyrata</i>	Castle Ruin Rauhenneck	48°00'22.36"	16°12'17.90"	362 m.n.n.	4n	ca. 100
AL29	<i>A. lyrata</i>	Berndorf	47°56'30.62"	16°06'54.19"	319 m.n.n.	4n	ca. 200
AL30	<i>A. lyrata</i>	Pernitz	47°55'09.19"	15°58'32.43"	548 m.n.n.	2n	300-600
AL31	<i>A. lyrata</i>	Reichental	47°53'03.16"	15°59'35.10"	425 m.n.n.	4n	ca. 50
AL32	<i>A. lyrata</i>	Castle Ruin Emmerberg	47°49'07.31"	16°06'04.66"	440 m.n.n.	4n	300-400
AL33	<i>A. lyrata</i>	Johannesbach Gorge	47°46'45.59"	16°02'37.90"	458 m.n.n.	4n	50-100
AL34	Hybrid	Kalte Kuchl	47°52'50.74"	15°41'37.52"	686 m.n.n.	4n	ca. 300
AL35	Hybrid	Halbach Valley	47°56'16.17"	15°41'55.23"	544 m.n.n.	4n	ca. 200
AL36	Hybrid	Gutenstein	47°52'34.59"	15°53'54.78"	486 m.n.n.	4n	1
AL37	Hybrid	Untermittlerbach	47°52'36.01"	15°36'48.38"	656 m.n.n.	4n	300-500
AL38	Hybrid	Castle Ruin Hohenberg	47°54'14.82"	15°37'23.65"	556 m.n.n.	4n	ca. 50
AL39	<i>A. arenosa</i>	St. Aegydt	47°50'54.04"	15°33'24.82"	602 m.n.n.	4n	>1000
AL40	<i>A. arenosa</i>	Kernhof	47°49'03.65"	15°32'19.97"	719 m.n.n.	4n	100-200
AL41	<i>A. arenosa</i>	Rechengraben	47°47'40.22"	15°21'19.51"	818 m.n.n.	4n	ca. 300
AL42	<i>A. arenosa</i>	Lake Hubertus	47°48'35.90"	15°22'37.40"	844 m.n.n.	4n	ca. 50
AL43	<i>A. arenosa</i>	Annarotte	47°52'02.55"	15°21'36.47"	869 m.n.n.	4n	50-100
AL44	Hybrid	Schrambach	47°59'40.12"	15°34'17.35"	392 m.n.n.	4n	ca. 50
AL64	<i>A. lyrata</i>	Manhartsberg	47°59'03.48"	16°09'49.32"	524 m.n.n.	2n	ca. 100
AL65	<i>A. lyrata</i>	St. Veiter Staff	48°01'48.36"	15°39'23.04"	635 m.n.n.	2n	ca. 100
AL70	<i>A. arenosa</i>	Totes Weib	47°43'38.86"	15°29'03.49"	898 m.n.n.	4n	ca. 30
AL72	<i>A. lyrata</i>	Höllental	47°45'05.76"	15°44'56.76"	612 m.n.n.	4n	ca. 50
AL73	<i>A. arenosa</i>	Faltbach	47°47'00.49"	15°10'46.00"	1020 m.n.n.	4n*	2
AL74	<i>A. lyrata</i>	Eng	47°42'56.37"	15°51'00.62"	815 m.n.n.	4n	ca. 30

Příloha 3b: Počet jedinců zařazených do jednotlivých analýz

Tabulka 1.

ID	Morfometrika	Ploidní úroveň	Velikost genomu	RADseq	Celkem sebráno
AL08	20	12	4	3	31
AL26	14	23	7	5	33
AL27	14	11	0	5	28
AL28	15	12	0	3	27
AL29	15	10	10	6	25
AL30	19	15	4	6	31
AL31	13	5	0	2	21
AL32	15	11	0	6	26
AL33	12	8	0	7	21
AL34	15	10	13	6	25
AL35	17	8	11	5	25
AL36	0	1	0	0	1
AL37	15	10	5	5	25
AL38	17	10	2	6	25
AL39	0	9	4	6	25
AL40	10	10	10	5	20
AL41	0	10	0	5	20
AL42	10	5	0	3	20
AL43	11	10	7	4	26
AL44	10	10	5	4	20
AL64	15	10	8	8	25
AL65	11	18	7	6	18
AL70	15	8	8	8	25
AL72	15	9	8	9	25
AL73	0	0	0	2	2
AL74	9	5	4	3	18
Celkem	307	250	117	128	588

Příloha 4. Seznam měřených morfologických znaků.

Tabulka 1. Červeně jsou vyznačené znaky, které byly vyřazeny na základě vysoké korelace s ostatními.

Kód znaku	Jednotka	Popis znaku
Tvar a velikost listů		
RosNTooths	počet	Počet zubů na terminální (nedělené) části největšího růžicového listu
RosNLobes	počet	Počet laloků dělené části největšího růžicového listu (počítá se každý samostatně, nikoliv v párech).
RosLSecT	binární 0,1	Přítomnost/absence sekundárních zubů v rámci dělené části listu
RosLTerL	[mm]	Délka terminální (nedělené) části největšího růžicového listu
RosLDivL	[mm]	Délka dělené části největšího růžicového listu
RosLPetL	[mm]	Délka "řapíku" největšího růžicového listu
RosLWter	[mm]	Šířka největšího růžicového listu - nejširší místo terminální části
RosLWdiv	[mm]	Šířka největšího růžicového listu - nejširší místo dělené části
StNTooths	počet	Počet zubů na terminální (nedělené) části druhého stonkového listu
StNLobes	počet	Počet laloků dělené části druhého stonkového listu (počítá se každý samostatně, nikoliv v párech).
StLTerL	[mm]	Délka terminální (nedělené) části druhého stonkového listu
StLDivL	[mm]	Délka dělené části druhého stonkového listu
StLPetL	[mm]	Délka "řapíku" druhého stonkového listu
StLWter	[mm]	Šířka druhého stonkového listu - nejširší místo terminální části
StLWdiv	[mm]	Šířka druhého stonkového listu - nejširší místo dělené části
*Lalok je oddělen zářezem zasahujícím alespoň do poloviny délky mezi střední žilkou a okrajem listu v nejširší části. Je-li zářez mělčí, jedná se o zub.		
Znaky na květních částech		
Petal colour	škála 0,1,2	Barva květu (0 - bílá, 1 - světle růžová (jakýkoliv náznak růžové barvy), 2 - tmavě růžová)
Petal length	mm	Délka petalu, měřeno na nejširším nepoškozeném petalu
Petal width	mm	Šířka petalu, měřeno na nejširším nepoškozeném petalu
Long (widest) Sepal length	mm	Délka vnějšího sepálu (měřen nejširší nepoškozený sepal)
Long Sepal width	mm	Šířka vnějšího sepálu (měřen nejširší nepoškozený sepal)
Short (widest) Sepal length	mm	Délka vnitřního sepálu (měřen nejširší nepoškozený sepal)
Short Sepal width	mm	Šířka vnitřního sepálu (měřen nejširší nepoškozený sepal)
Longest Filament	mm	Délka nejdelší tyčinky (pouze nitky, bez prašníků)
Carpel length	mm	Délka plodolistu (včetně blizny)
Znaky měřené na herbářové položce		
HPI	mm	Délka hlavního stonku (od kořenového nodu, kde kořen přechází v růžici), až po nejspodnější květ/plod
LAI	mm	Délka apikálního květenství hlavního stonku. Od nejspodnějšího květu/plodu, až po nejhornější květ/květní poupě.

NL	počet	Počet listů, včetně chybějících listů, pokud je patrné místo, kde byl list odstraněn.
NF	počet	Počet květů, počítají se květy, plody, či květní poupata větší než 2 mm.
DB	počet	Řád větvení. Za větev se počítá každá větev zakončená poupětem, která je podepřená vlastním listem.
DoMS	škála 0, 1, 2	Dominance hlavního stonku - 1: jediný hlavní stonk 2: hlavní stonk a výrazně menší laterální stonky 3: více stonků stejné velikosti
NS	počet	Počet stonků rozety, ze které vyrůstá hlavní stonk. Včetně hlavního stonku.
RB	počet	Počet kořenových nodů (buď výrazné ztlustliny nebo místa větvení kořene). Kořenový nód z něhož vyrůstá přízemní růžice se počítá jako první.
*Coby hlavní stonk se počítá ten nejdelší.		
Znaky na trichomech		
Trichomy na druhém největším růžicovém listu - adaxiální strana		
BigRTDU	%	Denzita trichomů
BigRTdomU	škála 1,2,3,4	Převažující typ trichomu (1 - jednoduchý, 2 - vidličnatý, 3- trifurkáttní, 4 - tetrafurkáttní až hvězdícovitý)
BigRT1U	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
BigRT2U	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
BigRT3U	binární 0,1	Přítomnost trifurkáttních trichomů
BigRT4+U	binární 0,1	Přítomnost tetrafurkáttních či hvězdícovitých trichomů
Trichomy na druhém největším růžicovém listu - abaxiální strana		
BigRTDL	%	Denzita trichomů
BigRTdomL	škála 1,2,3,4	Převažující typ trichomu (1 - jednoduchý, 2 - vidličnatý, 3- trifurkáttní, 4 - tetrafurkáttní až hvězdícovitý)
BigRT1L	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
BigRT2L	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
BigRT3L	binární 0,1	Přítomnost trifurkáttních trichomů
BigRT4+L	binární 0,1	Přítomnost tetrafurkáttních či hvězdícovitých trichomů
BigRL_apex.only	binární 0,1	Přítomnost trichomů pouze na špičce listu
Trichomy na dolní části stonku (od přízemní růžice po druhý stonkový list)		
LowSTD	%	Denzita trichomů
LowST1	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
LowST2	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
LowSTshape_p	binární 0,1	Přítomnost rovných trichomů
LowSTshape_k	binární 0,1	Přítomnost zvlněných trichomů
LowSTshape_s	binární 0,1	Přítomnost výrazněji zvlněných trichomů
Trichomy na třetím stonkovém listu - adaxiální strana		
3rdStLTDU	%	Denzita trichomů
3rdStLTdomU	škála 1,2,3,4	Převažující typ trichomu (1 - jednoduchý, 2 - vidličnatý, 3- trifurkáttní, 4 - tetrafurkáttní až hvězdícovitý)
3rdStLT1U	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
3rdStLT2U	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
3rdStLT3U	binární 0,1	Přítomnost trifurkáttních trichomů
3rdStLT4+U	binární 0,1	Přítomnost tetrafurkáttních či hvězdícovitých trichomů
Trichomy na třetím stonkovém listu - abaxiální strana		
3rdStLTDL	%	Denzita trichomů

3rdStLTdomL	škála 1,2,3,4	Převažující typ trichomu (1 - jednoduchý, 2 - vidličnatý, 3- trifurkáttní, 4 - tetrafurkáttní až hvězdíkovitý)
3rdStLT1L	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
3rdStLT2L	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
3rdStLT3L	binární 0,1	Přítomnost trifurkáttních trichomů
3rdStLT4+L	binární 0,1	Přítomnost tetrafurkáttních či hvězdíkovitých trichomů
3rdStL_apex.only	binární 0,1	Přítomnost trichomů pouze na špičce listu
Trichomy na horní části stonku (od druhého stonkového listu výše)		
UpSTD	%	Denzita trichomů
UpST1	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
UpST2	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
UpSTshape_p	binární 0,1	Přítomnost rovných trichomů
UpSTshape_k	binární 0,1	Přítomnost zvlněných trichomů
UpSTshape_s	binární 0,1	Přítomnost výrazněji zvlněných trichomů
Trichomy na poupatech		
FlowBTD_apex	binární 0,1	Trichomy přítomné pouze na špičce květního poupěte - 1, všechny ostatní možnosti - 0
FlowBTD_whole	binární 0,1	Přítomnost trichomů na celém květním poupěti
FlowBT1	binární 0,1	Přítomnost jednoduchých trichomů
FlowBT2	binární 0,1	Přítomnost vidličnatých trichomů
Poměrové znaky		
P1		LAI/HPI
P2		LAI/NF
P3		HPI/NL
P4		RosLTerL/RosLWter
P5		RosLDivL/RosLWdiv
P6		RosLDivL/RosNLobes
P7		RosLTerL/RosNTooths
P8		RosLCelkovaDelkaListuBezRapiku/CelkovyPocetZubu
P9		RosLCelkovaDelkaListuBezRapiku/PocetLaloku+1
P10		RosLDelkaTerminalnihoLaloku/CelkovaDelkaListuBezRapiku
P11		StLTerL/StLWter
P12		StLDivL/StLWdiv
P13		StLDivL/StNLobes
P14		StLTerL/StNTooths
P15		StLCelkovaDelkaListuBezRapiku/CelkovyPocetZubu
P16		StLCelkovaDelkaListuBezRapiku/PocetLaloku+1
P17		StLDelkaTerminalnihoLaloku/CelkovaDelkaListuBezRapiku
P18		Petal.length/Petal.width
P19		Long..widest..Sepal.length/Long.Sepal.width
P20		Short..widest..Sepal.length/Short.Sepal.width
P21		Long..widest..Sepal.length/Short..widest..Sepal.length
P22		Long.Sepal.width/Short.Sepal.width

Příloha 5a. Analýza hlavních komponent morfologických dat všech populací

Tabulka 1. Procenta vysvětlené variability, směrodatná odchylka a vlastní čísla pro prvních pět os.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Směrodatná odchylka	4.071166107	2.651377	1.896986	1.790827	1.58556
Procento zachycené variability	0.22705	0.0963	0.0493	0.04393	0.03444
Kumulativní procento	0.22705	0.32335	0.37264	0.41657	0.45101
Vlastní číslo	16.57439347	7.029799	3.598557	3.20706	2.514001

Tabulka 2. Vlastní vektory jednotlivých znaků. Modře vždy pět znaků nejvíce přispívajících k rozdělení podle příslušné osy. Znaků seřazené podle abecedy.

Znak	PC1	PC2	PC3
BigRL_apex.only	-0.0317188	0.0590757	-0.1290425
BigRT1L	0.041356	-0.0050437	0.0819762
BigRT1U	-0.101188	-0.017528	0.1593942
BigRT2L	0.1543837	-0.0546327	0.1457004
BigRT2U	0.0811892	0.010583	0.1671081
BigRT3L	0.2027473	-0.0749219	-0.0169405
BigRT3U	0.1802846	-0.0371335	0.037944
BigRT4.L	0.12078	-0.0482931	-0.168755
BigRT4.U	0.0977409	-0.0523886	-0.1348956
BigRTDL	0.202004	-0.0554899	0.0355645
BigRTdomU	0.1707117	-0.047551	0.1049917
BigRTDU	0.0927093	-0.0264008	0.2291864
Carpel.length	-0.0978786	-0.145079	-0.2041783
DB	0.1109462	-0.1665656	0.1157448
FlowBT1	0.2022019	-0.0719663	0.0018945
FlowBT2	0.1753785	-0.0534179	-0.0275999
FlowBTD_whole	0.0552529	0.0191325	-0.0605572
HPI	-0.0144395	-0.3022655	0.1631614
LAI	-0.0930009	-0.198769	0.07786
Long..widest..Sepal.length	-0.1147383	-0.1827271	-0.1602352
Long.Sepal.width	-0.0758736	-0.152979	-0.1626743
Longest.Filament	-0.1401686	-0.0986414	-0.2203339
LowST2	0.0690313	-0.0068704	0.0526912
LowSTD	0.1757849	-0.1290675	0.0485477
LowSTshape_k	0.1279045	-0.1518759	0.0871485
LowSTshape_s	0.0507543	-0.0710352	0.0603427
NF	-0.1006797	-0.1598065	0.0585064
NL	0.0290717	-0.151458	0.0016005
NS	0.0723299	-0.1382576	0.0599936
P1	-0.0484497	0.005695	-0.0796495
P11	-0.151138	-0.0797269	0.1141955
P14	-0.1562916	-0.1960921	0.0546172
P15	-0.0574725	-0.1935156	0.0462019

P18	0.0169331	0.0275931	0.0105403
P19	-0.0375368	0.0442921	-0.0523755
P2	-0.0592154	-0.1176398	0.132396
P20	-0.0082218	-0.0261073	0.0722864
P21	-0.0023929	0.0454857	0.0967349
P22	-0.0079485	0.0315728	0.1150519
P3	-0.0176894	-0.2088322	0.1801687
P4	-0.1490055	-0.0120801	-0.0373835
P6	0.0907755	-0.1529788	0.1020573
P8	-0.1092547	-0.0419957	-0.0025106
P9	-0.1545514	-0.093611	-0.0258746
Petal.colour	0.1168856	-0.0274062	-0.0984943
Petal.length	-0.1549564	-0.1383332	-0.2284042
Petal.width	-0.1365981	-0.1278858	-0.1932251
RB	-0.046619	0.0036283	-0.0283769
RosLPetL	-0.0978973	-0.1908026	0.0621796
RosLSecT	0.0722842	-0.0455364	-0.0821101
RosLTerL	-0.1322837	-0.2113213	0.0400696
RosLWter	-0.0012533	-0.2655931	0.085987
RosNLobes	0.1889463	-0.0781867	0.0350766
RosNTooths	-0.0112349	-0.0742674	0.0336216
Short..widest..Sepal.length	-0.1198139	-0.1668777	-0.2004853
Short.Sepal.width	-0.0870019	-0.1026904	-0.2463122
StLPetL	0.0721597	-0.2108213	0.0374274
StLTerL	-0.1061077	-0.2694485	0.0794879
StLWter	0.1202156	-0.1940921	-0.0706715
StNLobes	0.1703293	-0.0413389	-0.1489075
StNTooths	0.1589845	-0.0500521	-0.0045684
UpST2	0.0312492	-0.0269086	-0.0633242
UpSTD	0.1511729	-0.0553649	-0.2002877
UpSTshape_s	0.0789842	-0.0527112	-0.1773186
X3rdStL_apex.only	-0.0610742	-0.0051691	0.1185216
X3rdStLT1L	0.116234	-0.04623	0.0022868
X3rdStLT1U	0.0759969	-0.013917	-0.0056298
X3rdStLT3L	0.1913279	-0.0785992	-0.1191503
X3rdStLT3U	0.1680294	-0.0537664	-0.1659153
X3rdStLT4.L	0.1003693	-0.0388992	-0.0790501
X3rdStLT4.U	0.0720505	-0.0095339	-0.1469266
X3rdStLTDL	0.2025374	-0.0743154	-0.1209904
X3rdStLTDU	0.1807695	-0.060703	-0.1526852

Příloha 5b. Analýza hlavních komponent morfologických dat rodičovských druhů

Tabulka 1. Procenta vysvětlené variability, směrodatná odchylka a vlastní čísla pro prvních pět os.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Směrodatná odchylka	4.357787	2.762814	1.960173	1.677108	1.597152
Procento vysvětlené variability	0.26014	0.10456	0.05263	0.03853	0.03494
Kumulativní procento	0.26014	0.3647	0.41734	0.45587	0.49081
Vlastní číslo	18.99031	7.633141	3.842278	2.812692	2.550895

Tabulka 2. Vlastní vektory jednotlivých znaků. Modře vždy pět znaků nejvíce přispívajících k rozdělení podle příslušné osy. Znaky seřazené podle abecedy.

Znak	PC1	PC2	PC3
BigRL_apex.only	-0.0236951	0.0584554	-0.1584413
BigRT1L	0.0446876	-0.0085813	0.0247661
BigRT1U	-0.0946804	-0.0397141	0.2523897
BigRT2L	0.1555234	-0.0530565	0.0425172
BigRT2U	0.0668452	0.0375513	0.0433377
BigRT3L	0.2063259	-0.0653327	-0.0109962
BigRT3U	0.1876593	-0.0435648	-0.0077998
BigRT4.L	0.1250598	-0.0367379	-0.0516675
BigRT4.U	0.1054011	-0.0406669	-0.0404502
BigRTDL	0.2025954	-0.0524873	-0.0051201
BigRTdomU	0.1656337	-0.0410721	0.0914429
BigRTDU	0.0795178	-0.0322912	0.2772976
Carpel.length	-0.0839934	-0.1307548	-0.221072
DB	0.1073813	-0.1599211	0.0853172
FlowBT1	0.2092129	-0.0703009	-0.0141023
FlowBT2	0.1807414	-0.0407286	-0.0201815
FlowBTD_whole	0.0533794	0.025696	-0.0504394
HPI	-0.0199379	-0.2913281	0.1849237
LAI	-0.0768393	-0.2020169	0.1534946
Long..widest..Sepal.length	-0.1089335	-0.1791	-0.2089638
Long.Sepal.width	-0.0650915	-0.1708284	-0.2474741
Longest.Filament	-0.1311412	-0.0893569	-0.2755569
LowST2	0.0570609	-0.0035182	0.0493167
LowSTD	0.1725619	-0.1188379	0.0505644
LowSTshape_k	0.1229515	-0.1461706	0.0576543
LowSTshape_s	0.0558208	-0.0441487	0.0220899
NF	-0.0911382	-0.1603	0.1013847
NL	0.0324751	-0.1755708	-0.0123395
NS	0.0766556	-0.146943	0.0538897
P1	-0.0373875	0.0073109	-0.0526948
P11	-0.1619096	-0.0747423	0.0456181
P14	-0.1553234	-0.1940755	0.0321438

P15	-0.0889369	-0.1887376	0.0369154
P18	0.0149311	0.0316104	-0.0941036
P19	-0.0494696	0.0413864	0.1002643
P2	-0.0502872	-0.1185023	0.1876495
P20	-0.027801	-0.0058599	0.0255426
P21	-0.0014965	0.0426607	0.1476298
P22	-0.008919	0.0355092	0.1434047
P3	-0.0317251	-0.20614	0.2238584
P4	-0.1401756	-0.0205707	0.0981161
P6	0.0854774	-0.1408614	-0.0680297
P8	-0.0955829	-0.0517893	0.1460831
P9	-0.139767	-0.107879	0.1249556
Petal.colour	0.127632	-0.0356938	-0.009987
Petal.length	-0.1394944	-0.1387477	-0.2417069
Petal.width	-0.1240879	-0.1335925	-0.1461439
RB	-0.0416065	0.0027285	-0.0167449
RosLPetL	-0.0933709	-0.1933778	0.0579767
RosLSecT	0.08622	-0.0294095	-0.0452564
RosLTerL	-0.1195064	-0.2179836	0.1165996
RosLWter	0.0058137	-0.2717191	0.0436107
RosNLobes	0.1895377	-0.0796378	-0.0656534
RosNTooths	-0.0064746	-0.0718219	-0.0409333
Short..widest..Sepal.length	-0.1122988	-0.1637892	-0.2608546
Short.Sepal.width	-0.0699496	-0.1244914	-0.2888983
StLPetL	0.0548319	-0.2151382	0.0045049
StLTerL	-0.1105351	-0.2584452	0.0263734
StLWter	0.1301789	-0.2001502	-0.0350841
StNLobes	0.1787529	-0.0565622	-0.0728447
StNTooths	0.1787708	-0.0580341	-0.0429331
UpST2	0.0337649	-0.0304786	-0.0162236
UpSTD	0.1617693	-0.0620867	-0.0877156
UpSTshape_s	0.0862072	-0.0596833	-0.0821035
X3rdStL_apex.only	-0.0657663	-0.0223554	0.0547109
X3rdStLT1L	0.1178586	-0.0485241	-0.0124415
X3rdStLT1U	0.0731429	-0.0148082	0.0158712
X3rdStLT3L	0.1981275	-0.0705916	-0.0276108
X3rdStLT3U	0.1748683	-0.0528425	-0.0343025
X3rdStLT4.L	0.1041917	-0.0447603	-0.0039895
X3rdStLT4.U	0.0772166	-0.0119581	-0.044448
X3rdStLTDL	0.2044353	-0.0629018	-0.0276209
X3rdStLTDU	0.1857931	-0.0541973	-0.0305637

Příloha 6a. Kanonická diskriminační analýza morfologických dat pro celý datový soubor

Tabulka 1. Základní charakteristiky kanonických os

	1. kanonická osa	2. kanonická osa
Procento oddělení znaků	78.793	21.2017
Kumulativní procento	78.793	100
Vlastní číslo	7.1283	1.9185

Tabulka 2. Hodnoty vlastních vektorů pro každý znak. Modře vždy pět znaků nejvíce přispívajících k rozdělení podle příslušné osy. Znaky seřazené podle abecedy.

Znak	1. kanonická osa	2. kanonická osa
BigRL_apex.only	-0.155082244	0.05447019
BigRT1L	0.18111442	-0.092632022
BigRT1U	-0.498639723	0.129062008
BigRT2L	0.625308324	-0.202564018
BigRT2U	0.312630213	-0.290795914
BigRT3L	0.761804445	0.081228447
BigRT3U	0.779019432	-0.158732619
BigRT4.L	0.408722573	0.170820194
BigRT4.U	0.366636507	0.062279697
BigRTDL	0.771768143	-0.038449569
BigRTdomU	0.694240872	-0.120308237
BigRTDU	0.298264459	-0.086221726
Carpel.length	-0.282917459	-0.025863029
DB	0.569930703	-0.231793363
FlowBT1	0.83219006	0.156258902
FlowBT2	0.647792675	0.084044314
FlowBTD_whole	0.200273648	0.083701722
HPI	0.078816693	-0.110608707
LAI	-0.284777987	0.0498762
Long..widest..Sepal.length	-0.300946998	-0.110818527
Long.Sepal.width	-0.137218174	-0.022749829
Longest.Filament	-0.486041023	-0.090778398
LowST2	0.237438058	-0.054526032
LowSTD	0.730319517	0.086573212
LowSTshape_k	0.530514026	-0.028549004
LowSTshape_s	0.210486577	-0.028861308
NF	-0.352031607	-0.012029135
NL	0.111691284	0.11243516
NS	0.302335667	-0.167678206
P1	-0.185914077	0.058092171
P11	-0.51675371	-0.286086934
P14	-0.490973153	-0.14918731
P15	-0.167768938	-0.167495221
P18	0.080833262	-0.107747185

P19	-0.229448772	0.271743516
P2	-0.163317286	0.023393792
P20	-0.039818368	-0.201546395
P21	-0.055573106	0.033244527
P22	-0.049548535	-0.05715204
P3	0.079125935	-0.24228996
P4	-0.61898107	0.186571146
P6	0.45704478	-0.269960418
P8	-0.412596144	0.209978688
P9	-0.573442861	0.247382096
Petal.colour	0.473503032	0.372640213
Petal.length	-0.509957734	-0.006793776
Petal.width	-0.46609714	0.049468464
RB	-0.1925107	0.148166354
RosLPetL	-0.286055828	-0.001556927
RosLSecT	0.254399909	0.001467026
RosLTerL	-0.426293437	0.117306313
RosLWter	0.146279147	-0.039294621
RosNLobes	0.820935412	-0.272408732
RosNTooths	-0.005265122	-0.097295961
Short..widest..Sepal.length	-0.343842088	-0.079727058
Short.Sepal.width	-0.221694786	0.084818822
StLPetL	0.34492502	-0.111817909
StLTerL	-0.251576833	-0.196883364
StLWter	0.550342921	0.215237461
StNLobes	0.653869357	0.350358938
StNTooths	0.657016163	0.038155562
UpST2	0.120165541	0.094568587
UpSTD	0.561134367	0.388813148
UpSTshape_s	0.29677891	0.233560819
X3rdStL_apex.only	-0.197254642	-0.164952827
X3rdStLT1L	0.472761473	0.12228076
X3rdStLT1U	0.254187558	0.120332621
X3rdStLT3L	0.70000058	0.343094413
X3rdStLT3U	0.614951276	0.36932809
X3rdStLT4.L	0.306467581	0.212654607
X3rdStLT4.U	0.241517908	0.19007119
X3rdStLTDL	0.740887146	0.323427552
X3rdStLTDU	0.650140566	0.371675623

Příloha 6a. Kanonická diskriminační analýza morfologických dat pro rodičovské populace

Tabulka 1. Základní charakteristika kanonické osy

	1. kanonická osa
Procento oddělení znaků	78.793
Vlastní číslo	7.1283

Tabulka 2. Hodnoty vlastních vektorů pro každý znak. Modře vždy pět znaků nejvíce přispívajících k rozdělení podle příslušné osy. Znaků seřazené podle abecedy.

	1. kanonická osa
BigRL_apex.only	0.12748358
BigRT1L	-0.183336583
BigRT1U	0.458996598
BigRT2L	-0.690469953
BigRT2U	-0.221350709
BigRT3L	-0.875634309
BigRT3U	-0.835397069
BigRT4.L	-0.477628852
BigRT4.U	-0.434053873
BigRTDL	-0.860076514
BigRTdomU	-0.673263789
BigRTDU	-0.266127907
Carpel.length	0.279986141
DB	-0.532114008
FlowBT1	-0.961536293
FlowBT2	-0.755241508
FlowBTD_whole	-0.234095344
HPI	-0.041102942
LAI	0.256091464
Long..widest..Sepal.length	0.316466865
Long.Sepal.width	0.150269646
Longest.Filament	0.49323985
LowST2	-0.266106469
LowSTD	-0.777548215
LowSTshape_k	-0.558779367
LowSTshape_s	-0.22503428
NF	0.342728469
NL	-0.153564189
NS	-0.286191313
P1	0.150594646
P11	0.628369377
P14	0.547670132
P15	0.26604795
P18	-0.047019867

P19	0.215897759
P2	0.152626559
P20	0.114101762
P21	0.039962011
P22	0.061699064
P3	-0.000371853
P4	0.555736419
P6	-0.385379012
P8	0.322854613
P9	0.490099174
Petal.colour	-0.534314931
Petal.length	0.495003447
Petal.width	0.438468277
RB	0.140638784
RosLPetL	0.282234018
RosLSecT	-0.303538403
RosLTerL	0.385746266
RosLWter	-0.140732446
RosNLobes	-0.820814966
RosNTooths	0.035147609
Short..widest..Sepal.length	0.34891307
Short.Sepal.width	0.197120586
StLPetL	-0.367150625
StLTerL	0.315792494
StLWter	-0.642737007
StNLobes	-0.744152067
StNTooths	-0.818589341
UpST2	-0.134571184
UpSTD	-0.642230459
UpSTshape_s	-0.333241257
X3rdStL_apex.only	0.258237606
X3rdStLT1L	-0.556578199
X3rdStLT1U	-0.296526487
X3rdStLT3L	-0.816196178
X3rdStLT3U	-0.710615054
X3rdStLT4.L	-0.353978756
X3rdStLT4.U	-0.270899574
X3rdStLTDL	-0.845220548
X3rdStLTDU	-0.737529182

Elektronická příloha

K práci jsou přiloženy následující elektronické přílohy. K tištěné verzi jsou tyto přílohy přiloženy na CD.

Příloha 7. Soubor genlight (matice genetických dat)

Příloha 8a. Síť genetických vzdáleností pro kompletní datový soubor

Příloha 8b. Síť genetických vzdáleností pro tetraploidy

Příloha 9. Primární data cytometrické analýzy – ploidní úroveň

Příloha 10. Primární data cytometrické analýzy – velikost genomu

Příloha 11a. Primární matice morfologických dat všech znaků

Příloha 11b. Primární matice morfologických dat bez korelovaných znaků

Příloha 12. Krabicové diagramy variability všech morfologických znaků

Příloha 13a. Deskriptivní statistika všech znaků pro celý datový soubor

Příloha 13b. deskriptivní statistika všech znaků pro jednotlivé skupiny